التحضير النسيجي المجهري

Micro Technique

الأسس النظرية والعملية في التحضير المجهري للعينات النسيجية والخلوية

إعداد

أحمد عبد العزيز أبو عاقله

مستشفى الجامعة الأردنية

1999

دار

المستقبل للنشر والتوزيع

عمان **11118** الأردن

ص.ب. **184248** تلفاكس **4658263**

كافة حقوق التأليف والطبع والنشر
والتوزيع محفوظة للناشر

الطبعة الأولى

1420 هـ / 1999م

رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية
(1999/11/2084)

رقم التصنيف: 611

المؤلف ومن هو في حكمه: أحمد عبد العزيز أبو عاقلة وآخرون

عنوان الكتاب: التحضير النسيجي المجهري

الموضوع الرئيسي: 1. الأنسجة - تحضير مخبري

بيانات النشر: عمان/ دار المستقبل

* تم إعداد بيانات الفهرسة والتصنيف الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

مُقَدِّمَة

يعتبر علم الأمراض النسيجية Histopathology من أهم فروع علم الطب والهدف الأساسي لهذا الفرع هو تشخيص الحالات المرضية ولا تتم عملية التشخيص إلا بدراسة مقاطع نسيجية رقيقة محضرة على شرائح، دراسة مجهرية وحتى تكون الدراسة ناجحة ودقيقة لابد من أن تكون المقاطع المحضرة على درجة عالية من الإتقان وحتى يتم ذلك لابد لفني المختبر أن يكون على معرفة تامة بالأسس النظرية والعملية للتحضير النسيجي المجهري.

ولقلة المراجع العربية ولصعوبة فهم الكثيرين للمراجع الأجنبية فقد رأيت أن أضع معلوماتي النظرية التي إكتسبتها من خلال الإطلاع على الكثير من المراجع الأجنبية والعربية وعملية التدريب المستمرة التي أقوم بها لطلاب التحاليل الطبية من جامعات وكليات مجتمع مختلفة على مدار سنين طويلة بالإضافة إلى الخبرة العملية الطويلة أن أضع كل ذلك في كتاب يشتمل على الأسس النظرية والعملية للتحضير النسيجي المجهري ليكون مرجعا لطلبة العلم والفنيين في هذا المجال على حد سواء، وقد قمت بتقسيم الكتاب إلى مقدمة وأربعة أجزاء ويشتمل الجزء الأول على التحضير النسيجي باستخدام شمع البرافين وقد قسم الجزء إلى ثمانية فصول وهي على التتابع:

1. التثبيت Fixation.
2. المعاينة النظرية Gross Examination.
3. المعالجة النسيجية Tissue Processing.
4. الطمر Embedding.
5. القطع الدقيق Microtomy
6. الصباغة Staining
7. التحميل Mounting
8. الوسم Labelling

بينما يشتمل الجزء الثاني على القطع المجمد Frozen Section أما الجزء الثالث فيشتمل على دراسة الخلايا التقشرية Cytology والجزء الرابع والأخير يشتمل على أهم الصبغات الخاصة بالإضافة إلى بعض الملاحق الهامة في نهاية الكتاب.

في النهاية أتقدم بالشكر الجزيل لكل من ساهم في إنجاح هـــذا الكتـــاب وخروجه بأفضل صورة لخدمة العلم والمتعلمين وأخص بالشكر الزميلات والزملاء:

إعتدال محمد عبد العزيز	**سمر موسى دوديين**
إيمان عوني حنيفة	**نوال غالب أبو عوض**
عطاف أحمد البربراوي	**هيا محمد أحمد سلمان**

هداية عبد الله حسن حسن

راجيا المولى عز وجل أن يكون هذا الكتاب مصدر علم ينتفع به الناس.

والله ولي التوفيق

المؤلف



الأسس النظرية والعملية في التحضير المجهري

التحضير المجهري

مقدمة:

هناك طرق مختلفة للتحضير المجهري كما أن هناك طرق مختلفة للفحص النسيجي، والهدف من التحضير المجهري هو التحضير للدراسة المجهرية للعينات النسيجية.

1. وتشمل دراسة الأنسجة بالحالات الطبيعية وتدخل ضمن دراسة علم الأنسجة (Histology).
2. التحضير لدراسة العينات النسيجية المرضية (Histopathology).
3. التحضير للدراسة النسيجية الدقيقة بالمجهر الإلكتروني والتي تسمى (Ultrastructural Technique).
4. التحضير لدراسة الخلايا التقشرية (Cytology).
5. التحضير للدراسة الكيميائية المناعية في الأنسجة (Immunohistochemistry).
6. التحضير للدراسة الكيميائية في الأنسجة (Histochemistry).

وفي هذا الموضوع سيتم التركيز على التحضير المجهري للعينات النسيجية المرضية في مختبر علم أمراض الأنسجة (Histopathology Laboratory).

وحتى تتحقق فائدة كبيرة في دراسة التحضير المجهري لا بد من معرفة أو فهم كل كلمة من الكلمات المكونة لإسم المختبر فهما صحيحا.

المختبر:

هو المكان الذي تتم فيه الإختبارات أو الأبحاث أو الدراسات أو التحاليل أو التجارب أو الفحوصات بهدف التحقق من معلومات مسبقة أو التوصل إلى معلومات جديدة.

علم:

تختلف العلوم في تعريفاتها حسب طرق التوصل إلى المعلومات ومن هذه العلوم، العلوم التطبيقية وحيث أن علم الأمراض من العلوم التطبيقية فيكون تعريف العلم وبشكل مبسط هو: **معرفة خاضعة للتجربة.**

ملاحظة:

من المفيد معرفة ذلك حيث أن أي معلومة من معلومات هذا العلم تكون خاضعة للتجربة ومن معرفة مفهوم المختبر نعرف أن المختبر هو المكان الذي تتم فيه التجارب أو التطبيقات لمعرفة مدى صحة هذه المعلومات وبالتالي يمكن التأكد من صحة المعلومات عمليا، وحتى يتم فهم المرض بشكل جيد لا بد من فهم الأنسجة لأن فهم المرض يعتمد على فهم الأنسجة.

الأنسجة:

النسيج: هو مجموعة من الخلايا المتشابهة وظيفيا، وحتى تتم الفائدة لا بد من التعرف على التركيب التفصيلي للجسم حيث أن جسم الإنسان يتكون من مجموعة من الأجهزة وكل جهاز يتكون من مجموعة من الأعضاء وكل عضو من مجموعة من الأنسجة وكل نسيج يتكون من مجموعة من الخلايا والخلية تتكون من نواة وسيتوبلازم وغشاء خلوي ومن هنا نعرف أن الخلية هي الوحدة البنائية

للأنسجة ولفهم الأنسجة بشكل أكبر لا بد من التعرف على أنواع هذه الأنسجة حيث تشمل:

أ. الأنسجة الطلائية Epithelial Tissue.

ب. الأنسجة العصبية Nervous Tissue.

ج. الأنسجة الضامة Connective Tissue.

د. الأنسجة العضلية Muscular Tissue.

ويمكن إعتبار الدم من الأنسجة الضامة أو وضعه بشكل منفصل وبما أن جميع الأنسجة تتكون من خلايا وعرفنا مكونات الخلية فلماذا تختلف الأنسجة عن بعضها البعض؟.

إن إختلاف الأنسجة يرجع بالدرجة الأولى إلى تمايز الخلايا وتخصصها خلال مراحل التكوين الجنيني للإنسان بالإضافة إلى إختلاف المكونات الأخرى المكونة للأنسجة وهذا يقودنا إلى دراسة تركيب النسيج دراسة موجزة لإستكمال الفهم.

تركيب النسيج:

يتكون النسيج بشكل أساسي من خمسة مكونات رئيسية وهي:

أ. **الخلايا الحية:** وهي الوحدة البنائية والوظيفية الأساسية لجميع أنسجة الجسم.

ب. **الخلايا الميتة:** وهي خلايا تكون حية في بداية تكوينها وتموت الخلايا بهدف التخصص الوظيفي حيث تعمل هذه الخلايا على حماية الأنسجة الأخرى أو تعمل كدعامة للأنسجة الأخرى وتوجد في العديد من أنسجة الجسم مثل الطبقة الخارجية من الجلد طبقة الكيراتين كما توجد في الأظافر والشعر والعظام والغضاريف.

ج. **السوائل:** تقسم السوائل في جسم الإنسان إلى قسمين:

1. **سوائل داخل الخلايا:** وهي السائل المكـــون للســـيتوبلازم والســـائل النووي.

2. **سوائل خارج الخلايا: وتقسم إلى قسمين:**

أ. سوائل بين الخلايا **Inter Cellular Fluid**.

ب. **سوائل داخل فجوات وتجاويف وقنوات وحويصلات (خـــارج الخلايا)**. وهذه السوائل إما أن تكون على شكل إفرازات للغـــدد أو تكون أحد مكونات النسيج أو العضو ومثال على ذلك سائل التجويف الدماغي الشوكي C.S.F، وسائل التجويف البلـــوري Pleural Fluid وغيرها.

د. **المواد البينية:** وهي مواد عضوية مرتبطة أحيانا بمواد غير عضوية تترسب بين الخلايا لتعطي النسيج صلابة ودعامة.

هـــ. **الألياف:** وهناك ثلاثة أنواع من الألياف وهـــــي أليـــاف الكولاجـــين والألياف الشبكية والألياف المرنة وهذه الألياف تعطي دعامـــة وصلابـــة للأنسجة المختلفة.

وبعد معرفة تركيبه الخلية والنسيج والعضو وتركيبه الجسم بشكل عـــام لا بد من معرفة أن الأنسجة لا تبقى على شكل ثابت منذ تكون الإنسان من المرحلـــة الجنينيه حتى نهاية حياته بل هي معرضه للتغير والتجديد بإستثناء الخلايا والأنســـجة العصبية حيث أنها وبعد إكتمال النمو فهي غير قابلة للتجديد، ومـــن الضـــروري معرفة أن التغير الذي يطرأ على أنسجة الجسم نوعين:

أ. **التغير الطبيعي (الفسيولوجي) التغير الوظيفي:**

وهذا التغير يشمل النمو والتجدد التلقائي حيث أن أنسجة الجسم وخلاياه تبدأ بالنمو من المراحل الجنينيه الأولى وهذا النمو يشمل جميع أنســـجة وخلايـــا

الجسم ولكن ضمن حدود معينة وقد يتوقف نمو بعض الأنسجة والخلايا في مراحل معينة من العمر وأما التجدد التلقائي فهو معروف عن جميع الأنسجة والخلايا بإستثناء الأنسجة العصبية حيث أن جسم الإنسان يعوض جميع الخلايا التالفة بإستثناء الخلايا العصبية وبشكل دائم.

ولكن في بعض الأحيان يحدث التغير الفسيولوجي بشكل كبير وفي مراحل معينة من مراحل العمر وفي ظروف معينة ويميز هذا التغير الفسيولوجي بشكل عام:

1. أنه يحدث بناءا على حاجة الجسم.
2. أن الجسم يستطيع السيطرة على هذا التغير.

ومن الأمثلة على التغير الطبيعي الذي يحدث لأنسجة الإنسان وجسمه: النمو، التغيرات التي ترافق مرحلة المراهقة في الجنسين، التغيرات التي تحدث عند الحمل، التغيرات التي تحدث عند النساء في مرحلة اليأس وغيرها.

ب. التغير المرضي:

وهذا التغير يحدث للأنسجة في ظروف معينة بوضع غير طبيعي وما يميز هذا التغير أنه لا يحدث بناءا على حاجة الجسم كما أن الجسم لا يستطيع السيطرة عليه والحد منه إلا بالوسائل الدفاعية أو بإستخدام طرق العلاج المختلفة ومن هنا نصل إلى تعريف المرض.

المرض:

هو تغير غير طبيعي يحدث على أنسجة الجسم في ظروف معينة وبسبب عوامل معينة مما يؤدي إلى حدوث خلل وظيفي.

وقد يكون التغير بسيط مما يعني أن الخلل الذي أحدثه يكون طفيفا وبالتالي يكون بدون أعراض أو تكون أعراضه قليلة مما يصعب من الكشف عن المرض

وإظهاره وعندما يصل التغير إلى درجة يشعر معها الإنسان أنه في حالة مرضية يلجأ المريض غالبا إلى الأطباء للعلاج وحتى يكون العلاج شافيا وصحيحا لا بد من تشخيص المرض.

تشخيص المرض:

تعني هذه الكلمة الدراسة الشاملة الواضحة للحالة المرضية في جميع الجوانب وبالطرق المختلفة للوصول إلى نتيجة دقيقة عن الحالة المرضية وتتم غالبا على مراحل ثلاثة.

1. **التشخيص السريري:** ويتم هذا التشخيص من قبل الطبيب ويتم جمع المعلومات من خلال:
   أ. السيرة المرضية.
   ب. أعراض وعلامات المرض.
   ج. الفحص السريري.
2. **التشخيص عن طريق التحاليل المخبرية والأشعة:** لإستكمال التشخيص يلجأ الطبيب غالبا إلى الفحوصات المخبرية أو الأشعة وفي كثير من الحالات المرضية يلجأ إلى الإثنين معا (المختبر والأشعة) مما يزيد من الدقة في التشخيص إلا أنه في بعض الحالات يحتاج الطبيب إلى تشخيص دقيق ومعتمد لكي يقوم بالإجراءات اللاحقة مما يلزم اللجوء إلى الطريق الثالثه.
3. **التشخيص عن طريق دراسة العينة النسيجية:** وتتم هذه العملية في مختبر علم أمراض الأنسجة Histopathology.

الهدف من وجود المختبر:

يكمن الهدف من وجود المختبر في:

أ. تشخيص العينات النسيجية المرضية وهو الهدف الأساسي.

ب. عمل أبحاث علميه.

ج. تدريب الطلاب والمتدربين والفنيين أحيانا.

تشخيص العينات النسيجية المرضية:

يتم تشخيص العينات النسيجية المرضية في هذا المختبر ويقوم بذلك العمل طبيب متخصص في علم الأمراض ويدعى Pathologist وتتم عملية التشخيص على مرحلتين الأولى التشخيص العيني للعينة وتسمى Gross Examination وتكون بوصف العينة وصفا شاملا ويكون التشخيص في هذه الحالة مبدئي ويعطي صورة بسيطة عن الحالة المرضية أما التشخيص الرئيسي فيتم عن طريق الدراسة المجهرية للعينة المرضية Microscopic Examination ويلزم لتشخيص العينة النسيجية المرضية ***ثلاثة عناصر رئيسية وهي:***

أ. المجهر (Microscope) ويستعمل المجهر الضوئي العادي في تشخيص الحالات المرضية.

ب. الشريحة المجهرية المجهزة وتسمى (Microscopic Slide) وتحتوي على مقطع أو مقاطع نسيجية رقيقة يتم تحضيرها بواسطة طرق التحضير المجهري المختلفة التي سنتناولها بالتفصيل.

ج. النموذج المرفق للعينة (Lab-Request Form) ويتم تعبئة النموذج من قبل الطبيب الأخصائي (الجراح) أو الطبيب المعاين للمريض ومن المهم أن يتضمن النموذج اسم المريض ورقم ملفه وعمره وجنسه بالإضافة لإسم الطبيب المرسل للعينة والطابق الموجود به المريض كما ويحتوي النموذج

المرفق على مصدر العينة ومعلومات عــن الحالــة الســريرية للمريــض (Clinical Data) وعند توفر هذه العناصر الثلاثة يقوم الطبيب المختص في علم الأمراض (Pathologist) بتشخيص العينات عن طريق دراســة التغيرات التي طرأت على العينة النسيجية مجهرياً.

طرق تحضير المقاطع النسيجية:

يتم تشخيص العينات النسيجية وذلك بدراسة مقاطع نسيجية محضرة على شرائح مجهرية من تلك العينات ويتم تحضير الشرائح في المختبر ***بطريقتين***:

(1) تحضير المقاطع النسيجية بطريقة التجميد (Frozen Section).

(2) الطريقة الإعتيادية أي تحضير المقاطع النسيجية بإستخدام شمـــع الــبرافين (Paraffin Section).

(3) لدراسة شرائح تحتوي على عينات خلوية Cytology.

تحضير المقاطع النسيجية باستخدام شمع البرافين
Paraffin Section

ويتم تحضير المقاطع النسيجية من العينات المرضية باستخدام شمع الـــبرافين

وذلك بمرور العينات النسيجية بالمراحل التالية وبالترتيب:

وسنتناول هذه المراحل بالتفصيل مرحلة بعد الأخرى

الجزء الأول

Fixation	التثبيت	المرحلة الأولى
Gross	التشخيص العيني	المرحلة الثانية
Tissue Processing	المعالجة النسيجية	المرحلة الثالثة
Embedding	الإدماج (الطمر)	المرحلة الرابعة
Sectioning	عمل المقاطع النسيجية	المرحلة الخامسة
Staining	الصباغة	المرحلة السادسة
Mounting	تغطية الشرائح	المرحلة السابعة
Labeling	وسم الشرائح	المرحلة الثامنة

الفصل الأول

المرحلة الأولى: التثبيت

بعد إستئصال العينة النسيجية من جسم المريض (Biopsy) خزعة أو جسم الميت (Autopsy) يجب وضع العينة مباشرة في محلول التثبيت.

العينة النسيجية:

هي كل جزء يستأصل من جسم المريض بغض النظر سواء كانت جزء من العضو أو العضو كامل أو أكثر من ذلك.

التثبيت:

هو حفظ العينة النسيجية ويكون ذلك عن طريق إبقاء العينة النسيجية على وضع قريب من الوضع الذي أخذت فيه بمنع حدوث تغيرات على تلك العينة (تغيرات ما بعد الوفاة) (Post Mortum Changes) وتشمل:

أ. التحلل الذاتي، ب. التفسخ بفعل الكائنات الحية الدقيقة، جـ. تغيرات على الحجم، د. النشاطات الحيوية، هـ. خروج بعض المواد الذائبة.

طرق التثبيت:

(1) الطرق الفيزيائية وتشمل:

أ. الحرارة مثال شرائح البكتيريا.

ب. التجفيف بالهواء مثال شرائح الدم والعينات الخلوية Cytology.

ج. التجميد في حالة القطع المتجمد Frozen Section.

(2) **الطرق الكيميائية:**

وتشمل استخدام محاليل التثبيت وتقسم إلى:

أ. محاليل بسيطة.

ب. محاليل مركبة.

آلية عمل المثبت:

يعتمد المثبت في عمله على تخثر البروتينات أو عمل روابط بين جزيئاتها. المخثرات هي كلوريد الزئبق، حامض البكريك، حامض الكروميك، الإيثانول، وبمعنى آخر أنه يحول السيتوبلازم في الخلايا من الحالة الذائبة أو شبه الذائبة إلى الحالة الصلبة (يحول السيتوبلازم من محلول غروي إلى محلول معلق).

أهداف عملية التثبيت:

I. **حفظ العينات النسيجية:** وتتم هذه العملية بوضع العينة مباشرة في المثبت حيث يقتل المادة الحية في الخلايا ويوقف جميع النشاطات الحيوية فيها ويبقي العينة أقرب ما يكون للوضع الذي أخذت فيه وذلك بمنع حدوث تغيرات على العينة بعد إستئصالها من الجسم الحي أو الميت وهذه التغيرات والتي سبق أن ذكرنا أنها تشمل:

أ. **تغيرات في الشكل:** وهي الإنتفاخ بسبب دخول الماء إلى الخلايا أو الإنكماش بسبب خروج الماء من الخلايا وكون المثبت محلول متعادل في التركيز الأيوني (Isotonic Solution) فذلك يمنع التغير في شكل الخلايا والأنسجة وحجمها.

ب. **تغير في التركيب:** ويشمل ***أولا*** التفسخ بفعل الكائنات الحية الدقيقة (Putrefaction) والمادة المثبتة معقمة فليس هناك مجال للتفسخ، ***ثانيا:*** التحلل الذاتي (Autolysis) بفعل الأنزيمات الحالة

الموجودة في الليسوسومات والتي تنطلق بعد موت الخلية نتيجة زيادة الحموضة في الخلية وبالتالي تعمل على تحطيم وتحلل مكوناتها وبالإعتماد على آلية عمل المثبت فإنه يفقدها عملها ((كون الأنزيمات بروتينات فإن المادة الحافظة تفقد الأنزيمات القدرة على العمل)). ***ثالثا:*** المكونات الذائبة في الخلايا تبقى في الخلايا أو الأنسجة لأنها تتحول إلى مكونات غير ذائبة ويعود ذلك إلى آلية التثبيت.

II. **زيادة صلابة العينة:** بسبب تحويل المكونات الذائبة إلى مكونات غير ذائبة (صلبة) وذلك يفيد في:

أ. إعطاء الأنسجة القدرة على تحمل درجات الحرارة العالية.

ب. زيادة صلابة النسيج يسهل عملية أخذ مقاطع من العينات بعد تثبيتها في مرحلة المعاينة "Gross".

III. **زيادة نفاذية العينة للمحاليل الأخرى:** في عملية المعالجة وذلك يعتمد أيضا على آلية عمل المثبت حيث يزيد المسامات والفراغات في الخلايا والأنسجة مما يزيد في سرعة تخلل المحاليل المختلفة للعينة.

IV. **حفظ مكونات الأنسجة من حدوث تغيرات على الأنسجة خلال مراحل تحضير العينات:** مثل الإنكماش خلال عملية التجفيف أو الإنتفاخ خلال عملية الإشباع بالشمع ويتم ذلك بفعل آلية عمل المثبت فذلك يعطي شكل ثابت للخلايا والأنسجة ويمنع التغير على الشكل.

V. **زيادة قابلية النسيج للصبغات المختلفة:** كون المواد المثبتة تزيد من حامضية النواة أو قاعدية السيتوبلازم.

VI. **زيادة وضوح مكونات النسيج تحت المجهر**: وحتى الغير مصبوغة منها كون المادة المثبة تزيد الإختلاف في معامل الإنكسار بين أجزاء الخلية والنسيج وبالتالي يسهل التمييز بينها.

تعريفات:

المادة: كل شيء يتكون من نوع واحد من الذرات أو الجزيئات.

المحلول: مزيج متجانس من المواد يتكون من مواد مذابة ومواد مذيبة.

مواد التثبيت ومواصفاتها

مواد التثبيت:

أولا: الفورمالدهايد (Formaldehyde): وهو إسم تجاري

الإسم العمي هو مثيل الدهايد (Methylaldehyde) $H - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - H$.

مميزاته:

(1) غاز لا لون له ورائحته نفاذة وهو سريع الذوبان في الماء يذوب بنسبة 37-41%.

(2) يؤثر بسرعة لقدرته الكبيرة على التفاعل مع العديد من المواد الملونة ولمنع ذلك يضاف له 10-15% ميثانول.

(3) إذا ترك لفترة طويلة يتبلمر (رغم وجود الميثانول) ليكون بارافورمالديهاد أو يتأكسد ليكون حامض الفورميك والراسب الأبيض في المحلول المركز يدل على ذلك وهذا يضعف فعالية الفورمالين وللتخلص من الراسب يرج المحلول حتى لا يبقى الراسب ثم يفرغ في وعاء خاص يسمى Mason Jar ويغلف جيدا ويوضع في جهاز التعقيم لمدة 30 دقيقة ثم يبرد فيكون المحلول صافيا وقابلا للإستعمال.

(4) يحضر من أكسدة الكحول المثيلي (ميثانول) وهو عامل مختزل قوي يعتمد في التثبيت على قدرته على تكوين روابط بين جزيئات البروتين.

حسناته:

1- مثبت جيد للدهون المعقدة.
2- نفاذيته للأنسجة متوسطة.
3- سهل التحضير رخيص الثمن.
4- يحفظ البروتينات بشكل جيد (بروتينات السيتوبلازم والنواة) ويثبتها.
5- يعطي صلابة متوسطة للنسيج ويحافظ على الخلية.

سيئاته:

- لا يصلح لتثبيت المواد الكربوهيدراتية الذائبة.
- يتفاعل مع مادة الهيماتين الذي ينتج عن تحلل وتفكك خلايا الدم الحمراء ليكون رواسب مصبوغة تدعى(Formalin Pigment) وللتخلص منها توضع الشرائح في محلول كحول إيثيلي 80% مضاف إليه 1غم من هيدروكسيد الصوديوم لمدة نصف ساعة أو يستخدم كمحلول ملطف Neutral Buffered Formalin.
- يكون راسب أبيض بارافورمالديهايد إذا ترك لفترة طويلة من الزمن ويمكن تصفيته بالترشيح.
- بخاره يؤثر على العينين وعلى الجهاز التنفسي ويمكن أن يسبب التهابات جلدية عند ملامسته لفترات متعددة وطويلة.

ثانيا: جلوترالدهايد {$(CH_2)_3$ CHo. CHo}:

يستخدم كمحلول مخفف بتركيز 4% في محلول ملطف (Phosphate Buffer)، ويستخدم لتثبيت الأنسجة بهدف دراسة الأنزيمات أو الدهون أو دراسة العينات بواسطة المجهر الإلكتروني يوجد بشكل تجاري بتركيز 25% أو 50%.

حسناته:

1. مثبت جيد لعضيات السيتوبلازم.
2. يعطي الأنسجة صلابة كبيرة.

سيئاته:

- سائل عديم اللون له رائحة مميزة يمتزج مع الماء بسهولة.
- إذا تركت فيه العينة لمدة تزيد على ثلاثة ساعات يسبب صلابـــة وإنكماش للعينة يصعب معها عمل مقاطع نسيجية.

ثالثا: الكحول الإيثيلي CH_3CH_2OH (Ethanol):

لا يستخدم بشكل منفرد في تثبيت العينات إلا في حالات خاصة ويعمـــل من خلال ((تخثر البروتينـــات)) ويســتخدم بتركـــيز 95% لتثبيـــت عينـــات الـــ Cytology.

حسناته:

1. يزيد من صلابة النسيج.
2. يثبت البروتينات ولا يؤثر على الدهون.
3. يحفظ الجلايكوجين بشكل جيد إذا كان مطلق.
4. الأنسجة المثبتة به لا تحتاج إلى غسل بالماء.
5. نفاذيته سريعة.
6. سهولة إستعماله وتحضير تركيزات مختلفة منه.

سيئاته:

- يسبب إنكماش للخلايا.
- لا يصلح كمثبت للدهون.

رابعا: حامض الخليك الثلجي CH3CooH (Glacial Acetic Acid)

سائل عديم اللون ذو رائحة نفاذة مميزة، يسبب إنتفاخ مكونات الخليـــة وهو من أقدم المواد المستخدمة في التثبيت ويستخدم بنسبة 3-5% وتسمى المـــادة النقية منه حامض الخليك الثلجي لأنه يتجمد على درجة حرارة أقل مـــن 17°م ولا يستخدم بشكل منفرد في تثبيت العينات ويعمل على مبدأ ترسيب البروتينـــات دون تخثرها.

حسناته:

1. سريع في تخلله للأنسجة.
2. مثبت جيد للأنوية لأنه يرسب البروتينات.
3. يستعمل لدراسة الكروموسومات وفي دراسة التركيبات النووية.

سيئاته:

- يسبب إنتفاخ للخلايا ولذلك لا يستخدم بشكل منفرد في عملية التثبيت ويفضل أن يتبع استخدامه معاملة النسيج بالكحول.
- لا يثبت الدهون ولا المواد الكربوهيداتية ولا يستخدم لدراســـة الكالسيوم.
- يحطم عضيات السيتوبلازم وخاصة المينوكندريا وجهاز جولجي.
- يمنع تصلب الأنسجة ويبقيها طرية.
- لا يساعد في عمليات الصبغ.

خامسا: حامض البكريك: $(No_2)_3\ C6H_2oH$ (Picric Acid)

يستخدم كمحلول مشبع بتركيز 0.9-1.2% ويجب حفظه في مكـــان رطب وبارد لأنه إذا جف فإنه ينفجر ويعمل على مبـــدأ تخـثر البروتينـــات ولا يستخدم بشكل منفرد والمذيب ماء مقطر .D.W.

حسناته:

1. مثبت جيد للدهون لأنه لا يذيبها.
2. مثبت جيد للجلايكوجين.
3. جيد النفاذية وجيد في التثبيت.
4. يزيد من قابلية الأنسجة للصبغة الحامضيـــة يعمـــل كمرســـخ .Mordant

سيئاته:

- يسبب إنكماش كبير في الخلايا بنسبة 5%.
- يجب غسل الشرائح بعده بالماء لأنه يلون الشرائح باللون الأصفر.
- يجب حفظه في مكان رطب لأنه ينفجر إذا جف.
- لا يثبت المواد الكربوهيدارتية.

سادسا: ثنائي كرومات البوتاسيوم: $K_2Cr_2O_7$:

يستخدم كمحلول 5% ولا يخثر البروتينات ولكنه يعمل روابـــط بـــين جزيئاتها ولا يستخدم بشكل مفرد.

حسناته:

1. يثبت السيتوبلازم بشكل جيد.
2. مثبت جيد للدهون ولذلك يفضل وضع العينة الدهنية في محلـــول 3% منه.
3. يثبت الميتوكوندريا.

سيئاته:

1. يبقى النسيج طريا ولذلك لا يستخدم بشكل منفرد.
2. يعيق الصبغة ولذلك يجب غسل الشرائح بالماء لأنه يتأكسد مـــع الكحول ويكون رواسب خضراء وهي Chromic Oxide.
3. لا يثبـــت بروتينــــات النـــواة وبالتـــالي لا يفيـــد في دراســـة الكروموسومات.

سابعا: كلوريد الزئبق $HgCl_2$:

يستخدم كمحلول مشبع 7% ويرسب البروتينات من خلال تخثرها، وهو مركب سام إذا دخل الجسم عن طريق الجلد ولذلك يجب الحذر عند اســـتخدامه ولا يستخدم بشكل منفرد وهو من أهم الأملاح المستخدمة في التثبيت.

حسناته:

1. متوسط النفاذية إلى الأنسجة ويسبب إنكماش قليل للخلايا.
2. مثبت جيد للدهون.
3. يزيد من قابلية النسيج للصبغة ويجعل اللون أكثر تألقا.

سيئاته:

- يكون بلورات مترسبة نتيجة لترسيبه لجميع البروتينات في السيتوبلازم ولذلك يجب التخلص من هذه الترسبات البلورية قبل الصبغة.
- يسبب إنكماش الخلايا.

ثامنا: حامض الكروميك H_2CrO_3 (Chromic Acid):

يستخدم بنسبة 5% ويعمل على مبدأ تخثر البروتينات ولا يستخدم بشكل منفرد ويخثر بروتينات النواة بينما لا يخثر بروتينات السيتوبلازم.

حسناته:

1. يتخلل النسيج بسرعة ويصلب النسيج بدرجة متوسطة.
2. يثبت الدهون بشكل متوسط ويؤكسد السكريات إلى مركبات الديهايديه.
3. جيد لدراسة الكرموسومات لأنه يخثر الأحماض النوية.

سيئاته:

- لا يثبت بروتينات السيتوبلازم.
- لا يثبت المواد الكربوهيدراتية ولا يمزج بالفورمالين إلا عند الإستعمال.
- عامل مؤكسد قوي لذلك لا يمزج مع الكحول أو الفومالين لأنه يؤكسدها.

تاسعا: حامض الأوزميك OsO_4:

يستخدم كمحلول مائي بتركيز 1% يعمل على مبدأ عمل روابط بين البروتينات.

حسناته:

1. يثبت النواة والسيتوبلازم بشكل جيد.
2. يزيد من قابلية النواة للصبغات أكثر من السيتوبلازم.
3. يستخدم في تثبيت العينات الصغيرة لدراسة المجهر الإلكتروني.

سيئاته:

- يبقى النسيج طري ولذلك لا يستخدم بشكل منفرد.
- لا يثبت المواد الكربوهيدراتية وبطيء في نفاذيته.
- يختزل بالضوء والحرارة ولذلك يحفظ في الظلام في مكان بارد.

مما سبق نستنتج أن محاليل التثبيت البسيطة لا تستخدم بشكل منفرد حيث أن كل محلول له مواصفات وله حسناته وسيئات والمثبت الجيد يجب أن تكون سيئاته بسيطة قدر الإمكان بحيث لا يؤثر كثيرا على العينات النسيجية ولذلك يفضل استخدام محاليل التثبيت المركبة.

مواصفات المثبت الجيد:

1. أن تكون نفاذيته عالية بحيث يتخلل النسيج بسرعة والوقت يعتمد على أ. نوع النسيج ب. حجم العينة ج. نوع المثبت وسرعة تخلله.
2. أن يحتفظ المثبت بفاعليته لمدة طويلة مثل الفورمالين فعاليته لسنوات عديدة.
3. التكلفة المادية بحيث يكون أقل ما يمكن.

4. اختيار محلول التثبيت بحيث يكون أقل ضررا للصحة.

5. أن يكون إحداث التغيرات على النسيج أقل ما يمكن من حيث الإنكماش والإنتفاخ.

6. أن يكون المثبت مذاب في وسط متجانس مع المحلول المستخدم في المرحلة اللاحقة المستخدمة في مرحلة المعالجة.

7. أن يكون تحضير المثبت بكميات كبيرة سهلا وبوقت وجهد قليل ويعتبر أفضل محاليل التثبيت وأكثرها استخداما هو الفورمالين.

8. أن لا يسبب تلف أو إذابة مكونات الخلايا والأنسجة، ومن الناحية العملية تكون محاليل التثبيت بسيطة أو مركبة.

(لا يمكن استخدام مواد التثبيت كمواد نقية لذلك يجب أن تكون على شكل محاليل).

1. محاليل التثبيت البسيطة مثل الفورمالين 10٪:

الفورمالين: Formalin:

وهو أكثر أنواع محاليل التثبيت من حيث الإستخدام (المثبت العام) "أما المحاليل الأخرى فتستخدم لأغراض خاصة"..

ويستخدم الفورمالين كمثبت على شكل 10% فورمالين ملحي أو 10% فورمالين ملطلف.

طريقة تحضير الفورمالين الملحي 10% Formal Saline:

لتحضير لتر واحد من الفورمالين الملحي نتبع ما يلي:

1. نذيب 9غم من ملح كلوريد الصوديوم (Nacl) في لتر من الماء المقطر.

2. نأخذ 900 مل من المحلول (Saline) ونضيف عليها 100مل من الفورمالين المركز وبذلك يكون المحلول المثبت جاهز للعمل.

طريقة تحضير الفورمالين الملطف: **10% Neutralized Buffered Formalin**

لتحضير لتر واحد من الفورمالين الملطف نتبع ما يلي:

1. يذاب 7.57 غم من ثنائي صوديوم هيدروجين الفوسفات (Disodiumhydrogen Phosphate) الجاف و1.8غم من بوتاسيوم ثنائي هيدروجين الفوسفات Potassium Dihydrogen Phosphate في 900مل ماء مقطر Distilled Water.
2. نضيف 100 مل من الفورمالين مركز.
3. نضبط درجة الحموضة PH إلى 7.2 بإضافة حامض الهيدروكلوريد (HCL) أو هيدروكسيد الصوديوم (NaOH).

هناك صفات مشتركة كثيرة بين الفورمالين الملحي والفورمالين الملطف.

حسناته:

1- يثبت الفورمالين سواء كان ملحي أو ملطف جميع أنواع الأنسجة بدرجة متساوية.
2- يمكن إستعماله بجميع أنواع الأنسجة وخاصة أنسجة الجهاز العصبي.
3- يحدث إنكماش قليل في الخلايا.
4- لا يسبب صلابة زائدة للعينات النسيجية ولا يحدث أي تلف في العينات إذا حفظت فيه لمدة طويلة.
5- لا يتعارض مع الصبغات المستخدمة.
6- يحتفظ بفاعليته كمادة حافظة ومثبته لفترة طويلة بعد التحضير.
7- يثبت الشبكة الكروماتينية.

سيئاته:

- بطيء في نفاذيته للأنسجة وبالتالي تحتاج العينة لفترة طويلة نسبيا.
- بخاره يؤذي العينين والأغشية المخاطية في الأنف والحلق.
- بسبب إلتهاب الجلد عند ملامسته لفترات طويلة ومتكررة.

ويتميز الفورمالين الملطف عن الفورمالين الملحي بأن الفورمالين الملطف يمنع تكون رواسب بلورية في الأنسجة Formalin Pigments.

2. محاليل التثبيت المركبة:

1. محلول بوان Bouin's Fixative للتثبيت:

يحضر هذا المثبت كما يلي:

1. يحضر 750مل من محلول مشبع من حامض البكريك Picric Acid بتركيز 1%.
2. يضاف 250 مل فورمالين مركز.
3. يضاف 50مل من حامض الخليك الثلجي وبعدها تغسل العينات بمحلول 70% إيثانول مضافا إليه قطرات من كربونات الليثيوم المشبع.

يعتمد هذا المثبت على قدرته على تكوين روابط بين جزيئات البروتينات وخاصة الليفية منها ووجود حامض الخليك يقلل من أثر حامض البكريك في انكماش الأنسجة.

حسناته:

1. يسهل عملية الصباغة للأنسجة.
2. يحفظ الجلايكوجين.
3. لا يسبب تلف كبير للأنسجة.

سيئاته:

- نفاذيته للأنسجة ضعيفة ولذلك يستعمل في تثبيت العينات الصغيرة.
- لا يستعمل لتثبيت عينات الكلي لأنه يحدث فيهما تلفا شديدا.
- يحدث إنكماش للخلايا مما يؤدي إلى تكوين فراغات (Artifact) في الأنسجة.

2. مثبت زنكر Zenker Fixative:

يحضر المثبت كما يلي: تذاب المواد التالية بالترتيب بحيث تذوب كل مادة قبل إضافة المادة الأخرى في 100 مل ماء مقطر 1) 50غم كلوريد الزئبق 2) 2.5 غم من كرومات البوتاسيوم الثنائية Potassium Dichromate. 3) 1غم كبريتات الصوديوم وعند الإستعمال يضاف 5 مل من حامض الخليك الثلجي إلى 95 مل من المحلول ويحتوي المثبت على مخثرات للبروتين وهي كلوريد الزئبق والكرومات أما حامض الخليك فيمنع إنكماش الخلايا.

حسناته:

1. يثبت النويات بشكل جيد لإحتوائه على كلوريد الزئبق.
2. تزيد من قابلية النسيج للصبغات المختلفة لأنه يعمل كمرسخ للصبغة Mordant.

سيئاته:

- تحتاج العينة المثبتة فيه لفترة أطول في الهيماتوكسلين.
- يجب غسل الأنسجة بالماء بعد التثبيت به (مدة التثبيت 4-24 ساعة).
- يكون راسب بلوريه في الأنسجة يتخلص منه بطريقة إزالة رواسب الزئبق.

3. مثبت الجلوتر الدهايد Gluter Aldelyde:

ويحضر كالتالي: يستخدم كمحلول مخفف بتركيز 4% تحضر في محلول ملطلف (Phosphate Buffer)، ويجب أن تكون مدة التثبيت من ساعة إلى ساعتين ولا تزيد عن ثلاث ساعات.

حسناته:

1. يثبت البروتينات بشكل جيد.
2. يثبت عضيات السيتوبلازم.
3. يجعل الأنسجة صلبة.
4. يمكن من قطع شرائح دقيقة جدا للدراسة بواسطة المجهر الإلكتروني.
5. يسمح بنفاذ المادة البلاستيكية المستخدمة في إشباع الأنسجة وادماجها.

سيئاته:

- يعطي انكماشا في الأنسجة بدرجة متوسطة.
- غير ثابت ولذلك لا تترك فيه العينات النسيجية أكثر من ثلاثة ساعات.

4. مثبت كارنوي Carnoy's Fixative:

يحضر هذا المثبت كما يلي:

1. كحول مطلق 600 مل.
2. كلورفورم 300 مل.
3. حامض الخليك الثلجي 100مل.

يثبت الأنسجة العصبية بشكل جيد وخاصة لصبغة أجسام نسل في الخلايا العصبية وهو مثبت سريع الإنتشار يعمل بالإعتماد على قدرته على تخثر البروتينات ويفضل استخدامه للعينات التي تحتوي على الدهون حيث أن الكلوروفورم يذيب الدهون مما يتيح المجال لتمييز العقد اللمفاوية بصورة جيدة وخاصة عند البحث عن العقد اللمفاوية في عينات المساريقا Mesentry المحيطة بالأمعاء والأنسجة تحت الإبط Axilla المرافق لعينات الثدي يثبت العينات خلال 20 دقيقة إلى 3ساعات لأنه يسبب إنكماش الخلايا مع زيادة الوقت.

5 . مثبت سوسا (Susa Fixative):

ويحضر كما يلي:

1. كلوريد الزئبق 45غم.
2. كلوريد الصوديوم 5غم.
3. ثلاثي كلورو حامض الخليك 20غم Trichloroacetic Acid.
4. حامض الخليك 40 مل.
5. فورمالين 200 مل.
6. ماء مقطر 800 مل.

مثبت جيد وخاصة لأنسجة العضلات ويثبت العينات خلال3-24ساعة.

6 . الكحول الأثيلي (الإيثانول):

سائل لا لون له ودرجة غليانه 87^{o}م يشتعل وإذا كان خالي من الماء يسمى الكحول المطلق (Absolute) ويمزج مع الزايلين بشكل جيد له قدرة كبيرة على تجفيف الماء (محب للماء) Hydrophilic ولكن عندما يستخدم كمثبت يسبب إنكماش الخلايا ويعمل على مبدأ تخثر البروتينات ويرسب الجلايكوجين ويذيب الدهون ويستخدم بتركيز 95% كمثبت لعينات الخلايا التقشرية المتساقطة Cytology.

7. مثبت هللي:

تركيبه: نفس تركيب مثبت زنكر ويختلف بإضافة 5مل فورمالين بـــدل من حامض الخليك الثلجي عند الإستعمال ويثبت العينات خــلال 6-24ســاعة يثبت الأنسجة التي تحتوي على الدم مثل الطحال، العقد اللمفاوية والغدد بشــكل جيد.

8. مثبت جوموري Gomory:

تركيبه:

أ. فورمالين مركز جزء واحد $\frac{1}{6}$ الحجم الكلي.

ب. محلول مشبع من كلوريد الزئبق جزئين $\frac{2}{6}$ الحجم الكلي.

جـ. ماء مقطر 3 أجزاء $\frac{3}{6}$ الحجم الكلي.

مميزاته:

- سريع في تخلله للأنسجة مثبت جيد لمحتويات الخلية.

ملاحظات عامة على عملية التثبيت

1. تحضير محلول التثبيت وقد ذكرت طريقة كل مثبت سابقا.
2. إختيار المثبت الفعال والمناسب وذلك حسب الهدف من الدراسة لأنـــه لا يوجد مثبت مثالي لكل أنواع الأنسجة مثـــلا لدراســـة الجلايكوجـــين لا يستخدم مثبت يحتوي على الماء لأنه يذيبه ويعتبر الكحول المطلق في هـــذه الحالة مثبت جيد ومثال آخر إذا كان الهدف دراسة الدهـــون فيجـــب أن يكون المثبت خالي من الكحول وذلك لكون الكحول يذيب الدهون.
3. يجب أن يكون حجم المحلول المثبت أضعاف حجم العينة.
4. إختيار المقاطع بأقل حجم ممكن حتى يكون التثبيت بشكل كلي وإذا كانت العينات كبيرة يفضل أخذ مقاطع دقيقة قدر الإمكان.
5. فيما يتعلق بالعينات الصغيرة والهشة يجب التعامل معها بلطف عند وضعـــها بالمثبت لكي لا تتهشم.
6. فيما يتعلق بالعينات الصغيرة قابلة للإلتفاف والإنطواء يجب وضعها علـــى شبكة صغيرة خاصة كي تحافظ على ثبات الشكل مثل خزعـــات الكبـــد والأمعاء.
7. يجب وضع العينة مباشرة في المثبت كي لا تجف أو تتلف.
8. يجب أن يكون المثبت محيط بالعينة من جمع الجهات بحيث أن لا تكون العينة طافية أو ملتصقة بجدار الوعاء الموضوعة فيه.
9. إعطاء العينة الوقت الكافي بحيث تثبت بشكل كلي والوقت يعتمـــد علـــى سمك العينة وسرعة تخلل المثبت لها ونوع المثبت.
10. إذا كانت العينة ذات تجاويف كبيرة مثل عينة من الرئيتين فيفضل إدخـــال الفورمالين إلى داخل العينة بواسطة حقنة (سيرنج).

11. بالنسبة للعينات الكبيرة جدا كالأعضاء يفضل أخذ مقاطع منها تكفي لغرض التشخيص ووضع هذه المقاطع في المثبت ويفضل وضع باقي العينة في الثلاجة على درجة تحت الصفر.

12. إذا احتوى المثبت على كلوريد الزئبق فيجب معالجة الأنسجة كالتالي بعد إزالة الشمع ثم التدرج الكحولي (الأماهة) (Hydration) توضع العينات في محلول يتكون من 0.5غم يود في 70% إيثانول لمدة 3-5 دقائق ثم تغسل الشرائح بالماء المقطر وبعدها توضع في محلول صوديوم ثيوسلفيت تركيزه 2.5% حتى يزول لون اليود (لمدة دقيقتين وبعدها تكمل الصبغة حسب المطلوب يتفاعل كلوريد الزئبق مع اليود ليكون يوديد الزئبق ثم يتفاعل يوديد الزئبق مع ثيوكبرتيات الصوديوم يتكون رباعي ثيونات الزئبق حيث أنها تذوب في الماء وبالتالي يتم التخلص من الزئبق في العينة النسيجية.

13. وضع العينة في قارورة أو وعاء نظيف بحيث لا يحتوي على أي مواد تتفاعل مع محلول التثبيت وأن تكون محكمة الإغلاق حتى لا يتبخر محلول التثبيت.

14. يجب أن تتناسب حجم القارورة مع حجم العينة الموضوعة فيها لتسهيل إخراج العينة.

15. معاملة الأنسجة بعد التثبيت.

نوع المثبت	الخطوة اللاحقة
10% فورمالين ملحي	**80% كحول إيثيلي**
1. 10% فورمالين ملطف، مثبت بوان	Ethanol %80
2. مثبت سوسا، مثبت كارنوي.	95% كحول إيثيلي
3. مثبت زنكر، مثبت هلي، مثبتات أخرى.	تغسل بالماء فقط

III. معالجة الأنسجة القاسية (نتيجة التكلس):

التكلس (**Calcification**): ترسب الكالسيوم في المواد البينية للأنسجة على شكل أملاح تعطي الأنسجة قساوة وصلابة كبيرة.

محاليل نزع الكلس:

أ. محلول حامض النيتريك **Nitric Acid**:

ويحضر كالتالي:

1. حامض النيتريك 5مل (HNO_3).
2. فورمالين مركز 10 مل.
3. ماء مقطر 85 مل.

ب. محلول حامض الفورميك **Formic Acid**:

ويحضر كالتالي:

1. حامض الفورميك 5مل إلى 25مل.
2. فورمالين مركز 5مل.
3. ماء مقطر 90مل.

جـ. محلول حامض الهيدروكلوريد **Hcl** (**1**) أساسي (**IN**):

يحضر كالتالي:

1. حامض Hcl المركز 8.3 مل يضاف إلى 92.3 مل ماء مقطر.

ملاحظة:

يجب إضافة الحامض إلى الماء وليس العكس ويعتبر هذا المحلول أقوى وأسرع محاليل نزع الكلس حيث يستخدم لعدة ساعات ويجب معاملة شرائح أنسجة العظام بعد إزالة الكلس بهذه الطريقة بـ محلول 5% كلوريد الأمونيوم (محلول مائي لمدة 30 دقيقة قبل البدء بالصبغة.

د. محلول يتكون من:

1. حامض الهيدروكلوريك تركيز 8% (8% HCL Solution).
2. حامض الفورميك تركيز 8% (8% Formic Acid).

يمزج كميتان متساويتين من المحلول الأول والمحلول الثاني وتوضع فيه العينة وخاصة عينات نخاع العظم Bone Marrow على درجة حرارة 37^0م

جهاز نزع الكلس Decalcifier:

جهاز كهربائي يعتمد على وجود قطبين توضع عينة العظم على القطب الموجب بينما يكون القطب الآخر هو القطب السالب وعند وضعها في محلول موصل الكهرباء يسري التيار فيتسبب بتحلل أيونات الكالسيوم من العينة النسيجية حيث يترسب على القطب السالب ويتكون المحلول الذي يوضع في الجهاز من حامض الفورميك تركيز (90%) 10مل حامض الهيدروكلوريك المركز 8مل وماء مقطر يكمل الحجم إلى 100 مل ويمكن مسارعة العملية.

الكشف عند إنتهاء عملية نزع الكلس:

يمكن التأكد من إنتهاء عملية نزع الكلس بطريقة كيميائية وذلك بإضافة 1 مل من محلول 5% Sodium Oxalate أو Ammonium إلى 5% من محلول نزع الكلس المستخدم وبعد 5 دقائق إذا لاحظنا راسب أبيض تكون العملية غير مكتملة أما إذا كان اللون صافي فهذا يعني أن العينة أصبحت طرية.

صفات محلول نزع الكلس الجيد:

1. أن يكون له القدرة على نزع الكلس دون إحداث تلف.
2. أن لا يكون له أثر سلبي على مقدرة النسيج على تقبل الصبغات.

العوامل المؤثرة على سرعة نزع الكلس:

1. تركيز وقوة المحلول المعد لنـــزع الكلس تتناسب طرديا مع سرعة نزع الكلس.
2. درجة حرارة المحلول تتناسب درجة الحرارة طرديا مع ســـرعة نـــزع الكلس.
3. حجم المحلول إلى حجم العينة كلما زاد حجم المحلول زادت ســـــرعة نزع الكلس.
4. التحريك يزيد من سرعة نزع الكلس.

وكون جهاز نزع الكلس يوفر الحرارة والتحريك فذلك يزيد من ســـرعة نزع الكلس ويوفر الوقت وبعد الإنتهاء من عملية نزع الكلس يفضل وضع العينـــة في محلول كبريتات الصوديوم بتركيز 5%.

الفصل الثاني

المرحلة الثانية: المعاينة بالنظر Gross

وقبل أن تتم المعاينة بالنظر هناك خطوات تتم على العينات وهي:

I. **استلام العينات:** ويجب التأكد من أ. وجود العينة في الوعاء (القنينـة أو غيرها)، ب. يجب عمل مطابقة بين العينات والنماذج المرفقة معها، وهذه المطابقة: اسم المريض، ونوع العينة بالإضافة إلى معلومات أخرى قد توجد مثل إسم الطبيب المسؤول عن العينة (أو الذي أخذ العينة)، ورقم ملـف المريض، جـ. يجب التأكد أن الفحص المطلـوب Histopathology ويجب التأكد من أن العينة موضوعة في محلول التثبيت وبشـكل جيـد (راجع الناحية العملية في التثبيت)، وإلا يجب معالجة الوضـع مباشـرة وبعناية كي لا تتلف العينة وبعد التأكد من الفحص المطلوب إذا كـانت العينة موضوعة في Saline فقد يكون الفحص المطلوب TB (السـل) وليس باثولوجي لذا ترسل لقسم الزراعة، هـ. وجود معلومـات عـن الحالة المرضية (Clinical Data).

ملاحظة:

محلول التثبيت الذي يستخدم في المختبر هو الفورمالين وللتأكد مـن أن العينة موضوعة في الفورمالين ***هناك عدة طرق منها*** :

1. الشم حيث رائحة الفورمالين مميزة.
2. إضافة كمية قليلة من نيترات الفضة إلى كمية قليلة من المحلـول يتكون راسب أسود.

II. **ترقيم العينات:** وقبل معاينة العينات بالنظر لابد من ترقيمها وهذا يعني إعطاء العينات رقم متسلسل خاص بالمختبر يدعي Pathology Number ويكون التسلسل الرقمي متسلسل ولذلك تحمل العينة الرقم المتسلسل والسنة ويجب أن تكون هذه الأرقام مطابقة على كل من العينات والنماذج المرفقة معها وكذلك على الكبسولات التي ستوضع بها مقاطع العينات وبقلم رصاص أو بقلم خاص لا يتأثر بمحاليل المعالجة ولا يجوز إعطاء أكثر من مريض نفس الرقم المتسلسل خلال السنة الواحدة ويجوز إعطاء المريض الواحد أكثر من رقم على مدار السنة إذا كان للمريض الواحد أكثر من عينة فتعطى جميع عيناته نفس الرقم ويميز بينها برموز تضاف إلى الرقم وبعد ذلك تكون العينات مجهزة لمرحلة المعاينة بالنظر (Gross).

III. **المعاينة بالنظر (Gross):** وتتم هذه المرحلة غالبا من قبل الطبيب المختص في علم أمراض الأنسجة (Pathologist) بالإضافة لفني المختبر.

أ. أهداف عملية المعاينة بالنظر:

1. الحصول على مقاطع نسيجية من العينات بهدف تشخيصها مجهريا.
2. التشخيص الأولي للعينة Macroscopic Examination وذلك عن طريق ملاحظة التغيرات الظاهرية على العينات مثل التضخم والإحتقان الدموي أو وجود تلف أو تآكل في منطقة معينة أو تصلب في جزء معين أو وجود تكلس بالإضافة لملاحظة السائل أو المادة الموضوع بها العينة إذ لابد من التأكد من وجود العينة بالمثبت حيث أن عدم تثبيتها أو وضعها بالمثبت يؤدي إلى تغيرات على العينة تزيد

من صعوبة التشخيص إذا كانت ممكنة بالإضافة إلى المشاهدات والملاحظات التي يراها الطبيب بعد عمل مقاطع في العينة.

ب. ملاحظات عامة على عملية التقطيع:

1. يجب الحذر من حدوث أي تلوث بين العينات Contamination وذلك بغسل أدوات التشريح (التقطيع) بين العينة والأخرى بالماء بالإضافة إلى غسل اللوح المستعمل للتقطيع.
2. تغير شفرة القطع عند الضرورة أو حسب الحاجة لكي يتمكن من الحصول إلى مقاطع جيدة وبسهولة.
3. التعامل مع العينات وخاصة الصغيرة منها بلطف خصوصا إذا كانت هشة وعدم ضغطها بالملقط بقوة أثناء نقلها أو التعامل معها حتى لا تتلف أو تنكمش.
4. عدم ترك العينة أو العينات لفترة طويلة خارج المثبت حتى لا تجف لأن ذلك يؤدي إلى انكماش الخلايا وخاصة بالنسبة لعينات القطع المجمد (Frozen Section).
5. عدم غسل العينات الغير مثبتة بالماء إن أمكن حتى لا يحدث انتفاخ للخلايا وخاصة عينات القطع المجمد وعند الضرورة يستخدم المحلول الملحي (Saline) بدل الماء.

مواصفات المقطع الجيد:

1. أن يكون المقطع صغير الحجم قدر الإمكان 2×2سم على الأكثر وأن يكون قليل السمك 2-4 ملم.
2. يكون سطح المقطع مستوى.

3. أن يكون عدد المقاطع يتناسب مـــع العينـــة وســـهولة أو صعوبـــة التشخيص.

4. أن لا يحتوي المقطع أو العينة على أية بقايـــا مـــن عينـــات أخـــرى (Contamination).

طريقة أخذ المقاطع من العينات:

أولا: بالنسبة للعينات الصغيرة توضع العينة كلها وغالبا لا تحتاج إلى قطع ولذلـك يجب نقل العينة من الزجاجة إلى الكبسولة برفق بواسطة الملقط Forceps حـتى لا يحدث إنكماش أو تمتك لها وغالبا ما توضع العينة وتغلق في ورقة نفاذة (ورقـــة تنظيف العدسات (Lens Paper) حتى لا تسقط من ثقوب الكبسولة.

ثانيا: بالنسبة للعينات المتوسطة مثل الزائـــدة الـــدودية APPendix أو المـــرارة Gallbladder يؤخذ منها مقطعين أو ثلاثة أو حسب الحاجة.

ثالثا: بالنسبة للعينات الكبيرة والتي غالبا ما تمثل عضو من الأعضاء يفضل عمـــل المقاطع من العينة بعد تثبيتها وذلك لأن عملية التثبيت تعمل على زيـــادة صلابـــة النسيج مما يسهل عملية القطع وفي هذه الحالة يجب فتح العينة أو عمل مقـــاطع في العينة نفسها (Slices) وتركها في المثبت فترة من الزمن ثم تأخذ المقاطع منها مثـل عينات الثدي (Breast) أو الرحم (Uterus) والطحـــال (Spleen) أو الرئـــة (Lung) أو الغذة الدرقية (Thyroid Gland) أما الأمعـــاء فيجـــب فتحـــها وتنظيفها بالكامل ثم أخذ مقاطع منها أما العينات التي تشكل أحد أعضاء الجســـم الرئيسية مثل عينات الرجل (Leg) أو اليد (Hand) فتأخذ مقاطع حسب الحاجة وتوضع العينة في الثلاجة على درجة تحت الصفر وبعد أخذ المقاطع من العينـــات الكبيرة توضع في كبسولات تحمل رقم العينة ويمكن تمييز المقاطع حسب مكـــان المقطع أو طبيعته بإضافة رموز فرعية بالإضافة إلى الرقم على الكبسولات ولنـــأخذ

مثالا على ذلك الرحم يؤخذ مقاطع من الرحم وغالبا ما يرقم وتميز المقاطع برموز فرعية حسب الموقع فمثلا (أ) مقطع أو مقاطع من عنق الرحم (ب) مقطع أو مقاطع من جدار الرحم (جـ) مقطع أو مقاطع من أجزاء غير طبيعية من الرحم مثل الألياف (Fibroid) (د) مقطع أو مقاطع من المبيض الأيمن وقناة فالوب اليمنى إن وجدت (هـ) مقطع أو مقاطع من حويصلات من المبيض الأيسر إن وجدت (و) مقطع أو مقاطع من المبيض الأيسر وقناة فالوب اليسرى إن وجدت.

طريقة وصف المعاينة النظرية للعينات Macroscopic:

حتى يستفيد الطبيب المختص (Pathologist) من المعاينة النظرية للعينات (Gross) من خلال تشخيص العينات بالمجهر (Microscopic) لابد من كتابة وصف العينة بشكل تفصيلي على النموذج المرفق وهذا الوصف يشمل:

أ. إسم العينة حسب النموذج المرفق بالعينة.

ب. إذا كانت العينة موضوعة في محلول مثبت أولا.

ج. وصف طبيعة العينة من حيث درجة الصلابة، اللون، المكونات العددية إذا كانت بشكل قطع صغيرة أو متوسطة.

د. وصف مقاييس العينات من حيث الطول، القطر، المساحة، الحجم، الوزن.

هـ. وصف التغيرات الظاهرة على العينة من الخارج.

و. بعد عمل مقاطع في العينة أو فتحها عمل وصف كامل للعينة من حيث التغيرات الظاهرة على العينة من المقاطع أو من الداخل.

ز. أية ملاحظات أخرى تفيد في التشخيص للعينة.

هذا ويقوم في المختبر بتسجيل هذا الوصف على النموذج المرفق للعينة ويتم طباعة هذا الوصف على التقرير المرسل من المختبر إلى الطبيب المعاين للمريض تحت عنوان Macroscopic Examination أو Gross Examination.

الفصل الثالث

المرحلة الثالثة معالجة الأنسجة

Tissue Processing

وتشمل هذه المرحلة على أربع خطوات رئيسية وهي:

1. التثبيت Fixation.
2. التجفيف Dehydration.
3. التنقية والتشفيف Clearing.
4. الإشباع (التشريب) Infiltration.

وتعود عملية المعالجة للأسباب التالية:

أ. إعطاء صلابة للعينات النسيجية أو المقاطع المأخوذة منها للتمكن من عمل مقاطع رقيقة (3-7 ميكرون).

ب. كون المادة المستخدمة في إعطاء الصلابة للعينة (شمع البرافين) غير متجانسة مع مادة التثبيت (فورمالين) لأن الفورمالين محلول مائي والشمع غير متجانس مع الماء (Hydrophobic) فلا بد من التخلص من الماء بواسطة التجفيف (Dehydration) وكون مادة التجفيف (الكحول الإيثلي) غير متجانس مع البرافين فلابد من عملية التنقية بالزايلين ومن ثم تتم عملية الإشباع بالبرافين.

ج. إحتواء العينات النسيجية أو المقاطع المأخوذة منها على فراغات أو قنوات أو حويصلات أو أكياس أو غيرها مملوءة بالسوائل المختلفة فإن عمل مقاطع من العينات دون المرور بمراحل المعالجة والتخلص من السوائل

تؤدي إلى خروج هذه السوائل وانكماش العينات وتمزقها مما يزيد من صعوبة عمل المقاطع إن كانت ممكنة ولذلك فلا بد من استبدال هذه السوائل بمادة صلبة تحافظ على شكل النسيج وتزيده صلابة.

د. عملية المعالجة وفي مرحلتها الأخيرة تعطى العينة شكل ثابت بالإضافة إلى الصلابة وتعتبر هذه الطريقة من أفضل الوسائل لحفظ العينات لفترة طويلة من الزمن قد تصل إلى سنوات عديدة دون حدوث أي تغير على العينات.

الخطوة الأولى: التثبيت Fixation:

وقد ورد ذكرها بالتفصيل سابقا.

الخطوة الثانية: التجفيف Dehydration:

التجفيف: هو التخلص من الماء الموجود في العينة سواء أكان الماء الموجود أصلا من النسيج أو الماء الموجود في المثبت وبشكل تدريجي واستبداله بمادة التجفيف وذلك لأن الماء غير متجانس مع مادة الإشباع وهي شمع البرافين ويجب أن تتم بشكل تدريجي كي لا تسبب إنكماش أو تلف للعينة.

المواد المستخدمة في عملية التجفيف:

1) **الكحول الإثيلي Ethanol**: وهو المادة الشائعة لاستخدام في عملية التجفيف ويستعمل على شكل تدرج كحول متصاعد على الترتيب التالي:

1- كحول 80% لمدة ساعة.
2- كحول 95% (1) لمدة ساعة.
3- كحول 95% (2) لمدة ساعة.
4- كحول 95% (3) لمدة ساعة.
5- كحول مطلق 100% لمدة ساعة.
6- كحول مطلق 100% لمدة ساعة.

هذا إذا كانت المعالجة تتم بواسطة جهاز المعالجة الآلي أما إذا تمت المعالجة بشكل يدوي فيجب زيادة الوقت اللازم كل خطوة ويفضل لتحضير كحول ايثلي ذو تراكيز مختلفة أقل من 95%، استعمال الكحول الإيثلي بتركيز 95% للتخفيف وليس الكحول المطلق وذلك لارتفاع ثمنة ويحضر بالطريقة التالية:

1. **نحسب الحجم المطلوب في التركيز المطلوب كما يلي:**

$$ح_1 س_1 = ح_2 س_2$$

حيث $ح_1$ الحجم الأول، $ح_2$ الحجم الثاني، $س_1$ التركير الأول، $س_2$ التركيز الثاني.

2. **نكمل الحجم الناتج بالماء المقطر إلى حجم التركيز الأصلي.**

مثال:

إذا أردنا تحضير 95مل كحول إيثيلي 70% من كحول 95%.

1. **فيكون الحجم المطلوب 95مل×70% تركيز= $ح_2$×95%.**

$$ح_2 = \frac{95مل \times 70\%}{95مل} = 70مل$$

2. نكمل الحجم 70مل بواسطة الماء المقطر إلى 95مل بإضافة 25مل ماء مقطر ولكون الكحول الإيثلي غير متجانس مع شمع البرافين فلا بد من أن تتبعه خطوة التنقية بمادة متجانسة مع الكحول للتخلص منه ومن مميزات الكحول الإيثلي أنه غير سام ومتجانس مع الماء ويتخلل النسيج بسرعة إلا أنه يسبب إنكماش للعينات ويعطيها صلابة، يعتبر الكحول الإيثلي كحول مطلق إذا كانت كمية الماء فيه 2% أو أقل وللتأكد من ذلك يضاف قطرات من الكحول إلى قطرات من الزايلين فإذا تعكر المزيج فهذا يعني أن الكحول غير مطلق أي أن نسبة الماء أكبر من 2% وإذا كان المزيج صافيا فهذا يعني أن الكحول مطلق.

2) الأيزو بروبانول: **Isopropanol**: وهو أفضل بديـــــل للكحـــول الإيثيلي في عملية التجفيف في مرحلة المعالجة لأنه يسبب إنكماش وقســـــاوة بدرجة أقل من الكحول الإيثلي ولكنه لا يذوب في النيتروسليولوز ولذلـك لا يستخدم للتجفيف إذا كان النيتروسليولوز هو مادة الإدمـــــاج أو الإشـــباع ولكون الصبغات لا تذوب في الأيزوبروبانول فــــلا يســـتخدم في مرحلـــة الصباغة.

3) البيوتانول **Tertiarybutyl Alcohol**: وهو بديل جيد للكحـــول الأيثلي وهو متجانس مع الماء ومع البرافين ولذلك يستغنى عن عملية التنقية في حالة استخدامه في التجفيف إلا أنه بطيء النفاذية ويحتاج إلى وقت أطول.

4) الأستون **Acetone**: يستخدم للتجفيف كبديل للكحول الأثيلي إلا أنـه يتطاير بسرعة ويسبب إنكماش كبير للأنسجة.

5) الديوكسان **Dioxane** (**Diethyl Oxide**): وهذه المادة لديها القدرة على التجفيف والتنقية بنفس الوقت حيث أنها متجانســـة مـــع المـــاء والكحول والمركبات الهيدوكربونية بالإضافة لتجانسها مع شمع البرافين ومـــن مساوئها أنها مادة سامة لدرجة إذا تعرض الإنسان لبخارها فترة طويلة مـــــن الزمن بالإضافة أنها تسبب إنكماش الأنسجة بنسبة الثلث تقريبا بالإضافـــة أن عملية التجفيف بها تبقى كمية قليلة من الماء من النسيج مما يقلل من صلابتـــه وعند إستخدام الديوكسان في التجفيف يجب أن تكون الغرفة جيدة التهوية.

مواصفات المواد المستخدمة في التجفيف:

1. أن تكون المادة لها قابلية الذوبان بأية كمية من الماء.
2. أن تكون هذه المادة متجانسة مع المادة أو المواد المستخدمة في التنقيـــة وتذوب بأية كمية منها.

3. أن يكون الإنكماش الناتج عن عملية التجفيف باستخدام هذه المادة أقل ما يمكن وأن لا تسبب في زيادة صلابة العينة بدرجة كبيرة قد تؤدي إلى صعوبة القطع.

4. أن لا يبقى من العينة أي كمية ولو قليلة في الماء أي أن تكون عملية التجفيف بشكل كلي حتى لا يتكون فراغات في العينة بسبب عدم تخلل الشمع لها.

ملاحظات عامة على عملية التجفيف:

1- يجب أن تتم عملية التجفيف باستخدام تدرج متصاعد من مادة التجفيف المستخدمة حتى لا يحدث إنكماش أو تلف للعينات النسيجية.

2- يجب إعطاء الوقت الكافي لكل خطوة من خطوات عملية التجفيف كي لا يتبقى أي شيء من الماء في العينات النسيجية وعدم زيادة الوقت بصورة كبيرة كي لا يسبب زيادة كبيرة في صلابة العينات مما يؤدي إلى صعوبة الحصول على مقاطع رقيقة من العينات وخاصة في الخطوات التي يكون تركيز الكحول فيها 95% أو أكثر أول أقل من 70% أما فيما يتعلق بالكحول بتركيز 70% أو 80% فإن زيادة الوقت لا تؤثر على العينات.

3- في حالة استخدام بعض محاليل التثبيت مثل محلول زنكر أو محلول بوان يجب غسل العينات بالماء قبل البدء بمرحلة التجفيف.

الخطوة الثالثة: التنقية (التشفيف) Clearing:

التنقية: خطوة وسيطة بين التجفيف والإشباع حيث يتم إزالة بقايا مادة التجفيف وإذابة بعض المواد الموجودة في العينات مثل الدهون مما يجعل النسيج أكثر شفافية وفي حالة عدم تجانس مادة التجفيف مع مادة الإشباع تصبح التنقية ضرورية جدا.

مميزات مادة التنقية:

1. أن تكون مادة التنقية متجانسة مع مادة التجفيف ومادة الإشباع.
2. أن تزيد من شفافية النسيج.
3. أن لا تسبب صلابة كبيرة للعينة ولا تتلفها.
4. أن يتخلل النسيج بسرعة.
5. أن يكون تأثيراتها الجانبية قليلة.

المواد المستخدمة في عملية التنقية:

I. البترين ومشتقاته:

أ. الزايلين Xylene

ب. التلوين Toluine.

ج. البترين Benzen.

وأكثر هذه المواد استخداما هو الزايلين وهو سائل شفاف ليس له لون ورائحته نفاذة ومميزة ويحل محل الكحول أي أنه متجانس مع الكحول كما أنه متجانس مع شمع البرافين ويزيد من شفافية النسيج لأنه يذيب الدهون الموجودة في الأنسجة.

مساوئ هذه المواد الثلاث:

1. زيادة المدة فيها تسبب صلابة كبيرة للعينة وخاصة الأنسجة العضلية والأنسجة المحتوية على الألياف.
2. التبخر السريع لهذه المواد حيث تعتبر من المواد المتطايرة ومن الضروري أن تكون الأوعية محكمة الإغلاق خلال مرحلة المعالجة حتى لا تتطاير مادة التنقية من العينة وتترك فراغات تعمل عائق لدخول شمع البرافين مما يؤدي إلى تفتت العينة خلال القطع (عمل مقاطع رقيقة من العينات) وتعتمد سرعة التبخر للمادة على الضغط البخاري لها أكثر من اعتمادها على درجة الغليان.
3. هذه المواد الثلاث سريعة الإشتعال ولها أثر سام كما أنها تؤثر على المجاري التنفسية وتؤثر على الجلد عند الملامسة.

مقارنة بين البنزين ومشتقاته

البنزين	التولوين	الزايلين
1. تخلله للعينات سريع جدا.	1. تخلله للعينات أقل من البترين والزايلين.	1. تخلله للعينات سريع.
2. يتطاير بشكل سريع جدا حيث الضغط البخاري80ملم زئبق.	2. يتطاير بدرجة أقل من البترين وأكثر من الزايلين حيث الضغط البخاري 25ملم زئبق.	2. يتطاير بدرجة أقل من كل من البترين والتولوين حيث الضغط البخاري 5ملم زئبق.

البنزين	التولوين	الزايلين
3. يبقى العينات طرية بعد التنقية ولا يسبب انكماش لها.	3. لا يسبب انكملش للعينات ولا يعطيها صلابة.	3. يسبب بعض الإنكماش للعينات ويعطيها بعض القساوة.
4. يعطي النسيج شفافية قليلة.	4. يعطي النسيج شفافية متوسطة.	4. يعطي النسيج شفافية جيدة.

II. الكلورفورم Chloroform:

يستخدم في العديد من المختبرات كمادة للتنقية إلا أنه يسبب تلف لبعض الأنسجة وخاصة الألياف بالإضافة إلى أن درجة غليانه منخفضة (61^{o}م) وحيث درجة ضغطه البخاري مرتفع (160ملم زئبق) مما يزيد في سرعة تبخره كما أنه يتخلل الأنسجة ببطء ويسبب انكماش قليل للعينات ولكنه لا يسبب قساوة للعينات ولكنه لا يعطيها الشفافية.

III. **بعض الزيوت**: تستخدم بعض الزيوت في التنقية مثل زيت التربينبول وزيت خشب الأرز ولكن هذه الزيوت بطيئة في تخللها للعينات النسيجية وتحل محل الكحول ببطء بالإضافة إلى بطء إحلال شمع البرافين لها حيث تحتاج التنقية في حالة استخدام هذه الزيوت لفترة طويلة قد تصل إلى (12ساعة) ويمكن إضافة التولوين لهذه الزيوت في الخطوة الأخيرة بنسبة (1:1) لزيادة سرعة تخلل الشمع للعينات.

ملاحظات عامة في عملية الترويق والتنقية ...

1. إذا حصل تعكر لمحاليل الترويق فهذا يعني أن عملية التجفيف لم تكن مكتملة أي أن هناك بقايا ماء في العينات النسيجية ووجود بقايا الماء في العينة مما

يسبب صعوبة في القطع وللتخلص من ذلك يزال شمع البرافين بالزايلين ثم تعاد إلى الكحول المطلق وتعاد العملية.

2. زيادة الوقت في عملية الترويق بدرجة كبيرة يسبب قساوة للعينات وبالتالي تؤدي إلى صعوبة في عمل المقاطع النسيجية الرقيقة في عملية القطع.

3. عند استخدام جهاز المعالجة في عملية معالجة الأنسجة يفضل استخدام الزايليين كالتالي:

زايلين (1) : ساعة ونصف ...

زايلين (2) : ساعة ونصف ...

الخطوة الرابعة: الإشباع Infiltration:

الإشباع أو التشريب: تخلل شمع البرافين أو أي مادة بديلة للعينات النسيجية بعد تنقيتها وتشفيفها بشكل سائل حيث تحل محل مادة التنقية.

فوائد عملية الإشباع:

1. اعطاء صلابة للعينات النسيجية تمكن من الحصول على مقاطع رقيقة قد تصل إلى (3ميكرون أو أقل) باستخدام جهاز القطع الدقيق Microtome.

2. إعطاء شكل ثابت للعينات النسيجية حيث يعمل تخلل الشمع البرافين أو أي مادة أخرى بديلة كدعامة للعينات النسيجية تفيد في حفظ هذه العينات لمدة طويلة تصل إلى عدة سنوات.

المواد المستخدمة في عملية الإشباع:

1. شمع البرافين وهو أكثر مواد الإشباع استخداما في مختبرات الأنسجة والتحضير المجهري.

ومن مميزاته:

أ. أنه يتحول بسرعة من حالة الصلابة إلى حالة السيولة بالتسخين.

ب. يتخلل النسيج بسرعة في حالة السيولة.

ج. يتحول بسرعة إلى حالة الصلابة بالتبريد.

د. ينصهر على درجة حرارة معتدلة لا تؤثر على العينات النسيجية ولا تحدث تلفا لها.

هـ. عند تجمد الشمع تصبح العينات صلبة لدرجة تمكن من الحصول على مقاطع رقيقة ويتراوح درجة انصهاره الشمع الطري ($50-52^0$) أما الشمع الصلب فتتراوح درجة إنصهارها ($60-68^0$م) ولكن أفضل أنواع البرافين استخداما بدرجة إنصهاره ما بين (56^0م-58^0م) وذلك لكونه وسطا بين الشمع الصلب والشمع الطري حيث يناسب جميع أنواع العينات وجميع الأجواء والظروف.

شمع البرافين طري	شمع البرافين صلب
1. يستخدم للأنسجة الطرية.	1. يستخدم للأنسجة الصلبة.
2. يستخدم للحصول على مقاطع سميكة 10-20ميكرون.	2. يستخدم للحصول على مقاطع رقيقة 3-7ميكرون.
3. يستخدم في الظروف الباردة.	3. يستخدم في الظروف الحارة.

2. **البارابلاست**: وهو مزيج من شمع البرافين ومبلمر البلاستيك.

3. **النيتروسيلوز**.

4. **البلاستيك**: مزيج من شمع البرافين والمطاط.

5. الصمغ الصناعي **Synthetic Resin**: يستخدم للحصـــول علـــى مقاطع رقيقة جدا لتحضيرات المجهر الإلكتروني بالإضافة لعينات العظـــم غـــير منـــزوعة الكلس.

ملاحظات عامة على عملية الإشباع:

1. يجب أن تكون درجة حرارة المسخن المحتوي على الشمع أعلى مـــن درجـــة إنصهاره بخمسة درجات مئوية ويجب أن يكون الشمع منصهر بشكل كـــامل وجيد لتسهيل عملية تخلل الشمع للأنسجة وزيادة الحرارة عن ذلـــك بكثـــير يؤدي إلى حرق وطبخ العينة.
2. عند استخدام جهاز معالجة الأنسجة يستعمل وعائين منفصلين للشمع توضعان في سخانين شمع برافين الأول لمدة ساعتين وشمع برافين الثاني لمدة ساعتين.
3. يمكن وضع العينات في الشمع تحت ظروف مفرغة من الهواء مما يقلل في الوقت اللازم للإشباع ويتم التخلص من مادة التنقية بشكل عام ويكـــون الضغـــط حوالي $15Lb/in^2$ (300 – 500) ملم زئبق، وذلك يقلل مـــن تكـــون فقاعات الهواء في العينات إذا تكونت.
4. يمكن الحصول على مقاطع عديدة ومتسلسلة باستخدام شمع البرافين بشـــكل أفضل من المواد الأخرى المستخدمة في الإشباع.
5. عند وجود بقايا لمادة التنقية بعد عملية الإشباع فذلك يبقى العينة النســـيجية طرية مما يؤدي إلى صعوبة في القطع.
6. وقت الإشباع يعتمد على:
   أ. حجم العينة أو المقطع النسيجي وسمكه.
   ب. نوع النسيج.
   جـ. سرعة تخلل مادة الإشباع.
7. زيادة وقت الإشباع يؤدي إلى زيادة صلابة العينة وإنكماشها ممـــا يزيـــد في صعوبة التقطيع والحل هذه المشكلة يكون باستخدام محلول التطرية.

الطرق العملية في معالجة الأنسجة:

أ. الطريقة اليدوية:

حيث يتم نقل العينات النسيجية أو المقاطع المأخوذة منها بطريقة يدوية من وعاء لآخر حسب الترتيب والوقت التالي:

1. الفورمالين: توضع العينات فيه لمدة قد تصل من 5ساعات – 12 ساعة.
2. كحول إيثيلي 80% لمدة ساعة ونصف.
3. كحول إيثيلي 95% لمدة ساعة ونصف.
4. كحول إيثيلي 95% لمدة ساعة ونصف.
5. كحول إيثيلي 95% لمدة ساعة ونصف.
6. كحول إيثيلي مطلق لمدة ساعة ونصف.
7. كحول إيثيلي مطلق لمدة ساعة ونصف.
8. زايلين Xylene لمدة 3ساعات.
9. زايلين Xylene لمدة 3ساعات.
10. شمع البرافين (1) لمدة 3-6 ساعات في فرن درجة حرارة أعلى من درجة انصهار الشمع بـــ 5 درجات مئوية.
11. شمع البرافين (2) لمدة 3-6ساعات.

وبما أن عملية المعالجة اليدوية تحتاج إلى وقت طويل وجهد كبير بالإضافة إلى حاجتها إلى مناوب ليلي وأيام العطل والأعياد من هنا كانت الحاجة إلى وجود جهاز آلي لمعالجة الأنسجة.

ب. الطريقة الآلية: جهاز معالجة الأنسجة الآلي

Tissue Processor

يقوم جهاز المعالجة بعمل جميع خطوات المعالجة وهي التثبيت والتجفيف والتنقية والإشباع بطريقة آلية حيث توضع العينات أو مقاطع منها في كبسولات خاصة تحمل أرقام هذه العينات في سلة وتعلق في موضع التعليق في جهاز المعالجة ويشغل الجهاز بعد برمجته حيث يقوم بجميع هذه الخطوات بطريقة آلية عندما ينقل العينات من وعاء إلى آخر حسب الترتب أو البرنامج المعد له.

مميزات جهاز المعالجة:

1. **اختصار الوقت اللازم لعملية المعالجة:** حيث تفيد عملية التحريك المستمر في زيادة سرعة تخلل المواد المستعملة في المعالجة للعينات.
2. عملية المعالجة تحتاج إلى وقت طويل يزيد عن 15 ساعة بالإضافة لوجود أيام عطل وأعياد مما يزيد من صعوبة القيام بالمعالجة بشكل دائم ويومي بالطريقة اليدوية ولذلك فإن جهاز المعالجة يمكن من القيام بعملية المعالجة أثناء الليل وفي أيام العطل والأعياد مما يوفر على الفني الجهد والوقت بدل العمل على فترات أو مناوبات.
3. قيام الجهاز بعملية المعالجة بشكل آلي يضمن أن تتم بشكل صحيح ومتقن حيث أن برمجة الجهاز توفر ضبط الحركات والوقت لكل خطوة بدل الإعتماد على الذاكرة أو ساعة التوقيت.

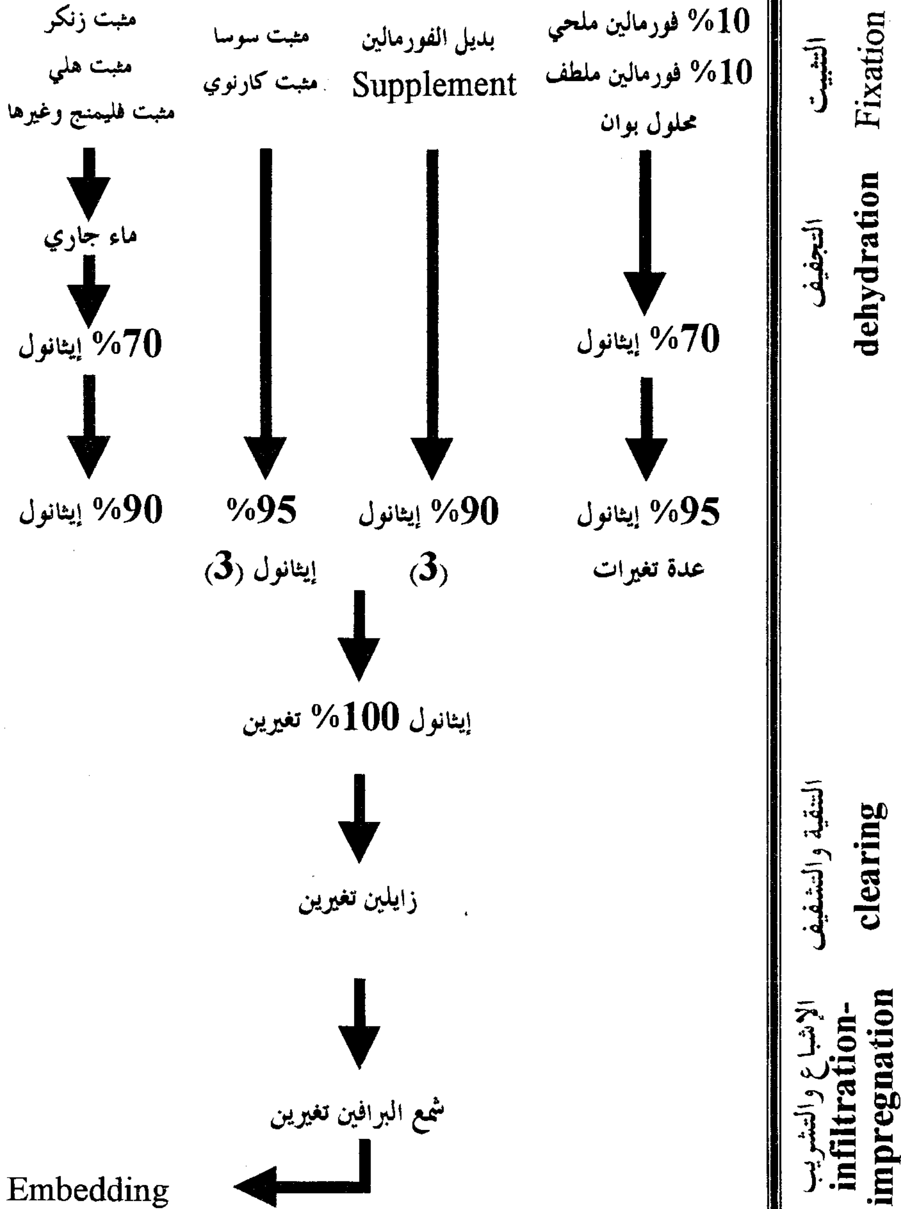
برنامج مفصل لجهاز المعالجة

الخطوة	الوقت	الهدف
1. الفورمالين 10% (1)	1-3ساعات	التثبيت Fixation
2. فورمالين 10% (2)	3 ساعات	التثبيت Fixation
3. إيثانول 80%	ساعة واحدة	التجفيف **Dehydration**
4. إيثانول 95% (1)	ساعة واحدة	التجفيف **Dehydration**
5. إيثانول 95% (2)	ساعة واحدة	التجفيف **Dehydration**
6. إيثانول 95% (3)	ساعة واحدة	التجفيف **Dehydration**
7. إيثانول 100% (1)	ساعة واحدة	التجفيف **Dehydration**
8. إيثانول 100% (2)	ساعة واحدة	التجفيف **Dehydration**
9. زايلين (1)	ساعة ونصف	التنقية والتشفيف Clearing
10. زايلين (2)	ساعة ونصف	التنقية والتشفيف Clearing
11. شمع برافين (1)	ساعتان	الإشباع Infiltration
12. شمع برافين (2)	ساعتان	الإشباع Infiltration

تشغيل جهاز المعالجة:

1. تملأ الأوعية بالمحاليل المخصصة لكل خطوة كما في البرنامج السابق.
2. بعد وضع العينات أو مقاطع منها في كبسولات تحمل أرقامها ووضع هذه الكبسولات في السلة المخصص لذلك توضع أو تعلق السلة في الموضع الخلص لذلك في جهاز المعالجة.
3. يوضع برنامج مخصص لعملية المعالجة حسب الترتيب السابق ويراعي وجود أيام عطل وأعياد ثم يشغل الجهاز بحيث يقوم الجهاز بالحركات الثلاثة المعروفة وهي الإهتزازية (صعودا أو نزولا) الحركة العمودية للأعلى والأسفل والحركة الدورانية لنقل السلة من وعاء إلى آخر.
4. بعد الإنتهاء من عملية المعالجة تحمل السلة وتبدأ عملية الطمر (Embedding).

المخطط العام لعملية معالجة الأنسجة



ملاحظات عامة على جهاز عملية المعالجة

1. يجب الإنتباه بشكل للمحاليل والأوعية المستعملة في المعالجة وتغيير المحاليل عند اللزوم ويفضل تغيير الفورمالين والكحول الإيثيلي بنسبة 80% يوميا أو يوم بعد يوم وتغيير الكحول 95% الأول يوم بعد يوم ونقل الكحول 95% الثاني بدل الأول والثالث ووضع الكحول 95% الجديد في الترتيب الثالث وتغيير الكحول المطلق مرة بالأسبوع على الأقل وتغيير الزايلين مرة كل أسبوعين على الأقل وتغيير شمع البرافين كل ثلاثة أسابيع أو كل شهر وتقل الفترة بزيادة عدد العينات وتزيد إذا نقصت العينات.
2. يجب مراعاة العطل والأعياد عند تشغيل الجهاز واستخدام البرنامج الخاص بذلك وذلك يعتمد على عدد أيام العطل حيث أن بعض الأجهزة يمكن أن تفيد بوجود أيام عطل تصل إلى ستة أيام وتكون العينات خلال فترة العطلة في الفورمالين.
3. يجب العناية المستمرة بجهاز المعالجة وصيانته عند اللزوم.
4. عند توقف الجهاز في أي مرحلة من مراحل المعالجة يجب الإنتباه إلى ما ينتج عند ذلك من مشاكل ومحاولة حل هذه المشاكل مع الإنتباه أو البحث عنه سبب توقف الجهاز وإذا كانت نتيجة خطأ فني أو كهربائي أو خطأ من برنامج العمل أو طريقة تشغيله ومن المهم معرفة وقت وفترة توقف الجهاز ويعتمد حل مشكلة الجهاز حسب الخطأ كهربائي يجب صيانة الجهاز كهربائيا ويفضل ربط الجهاز بمصدر كهربائي غير خاضع لإنقطاع التيار أي وجود مصدر بديل وسريع التركيب والتوصيل وإذا كان الخطأ في تشغيل الجهاز يمكن حل ذلك بسهولة وبإعادة التأكد من البرنامج ومدى صلاحيته.

مرحلة التوقف	المشكلة الناتجة وحلها
أ. إذا توقف الجهاز في الخطوة الأولى وهي الفورمالين.	لا يؤثر ذلك على العينات ويكمل البرنامج بشكل اعتيادي دون أي إشكال.
ب. إذا توقف الجهاز في الكحول الإثيلي بتركيز 80%.	لا يؤثر ذلك على العينات ويكمل البرنامج كالمعتاد.
ج. إذا توقف الجهاز في الكحول الإيثيلي 95% أو الكحول 100%.	بسبب زيادة في صلابة العينة تؤدي إلى صعوبة في عمل المقاطع فتستخدم محلول التطرية ثم تكمل البرنامج.
د. إذا توقف الجهاز في الزايلين.	يسبب صلابة كبيرة تؤدي إلى زيادة صعوبة القطع كما هو الحال في السابق.
هـ. إذا توقف الجهاز في الشمع لمدة طويلة تزيد عن 5ساعات.	تؤدي إلى زيادة في صلابة العينة مما يؤدي إلى صعوبة في القطع تستخدم محلول التطرية ثم تكمل البرنامج.
و. إذا توقف الجهاز أو السلة في الهواء.	يؤدي إلى جفاف العينات وحل هذه المشكلة يكون بوضع العينات في فورمالين 10% مضافا إليه جليسرين بنسبة 1-10 وذلك لتطرية العينات وذلك بعد إرجاع العينات إلى الفورمالين بشكل عكسي أو : 1. إعادة العينات إلى الخطوة التي توقف فيها وإطالة الوقت. 2. أو استخدام محلول تيكون من 70% إيثانول 70مل+جلسرين 30مل لعدة ساعات.

5. إذا حصل خطأ وانتقلت السلة في شمع البرافين بعد نهاية برنامج المعالجة إلى الفورمالين مرة أخرى حل هذه المشكلة يكون بإعادة السلة إلى شمع البرافين مرة أخرى مع التحريك ويفضل أن تمر بواعئين محتويات على الشمع.

الفصل الرابع

المرحلة الرابعة: طمر العينات الإدماج Embedding

الطمر الإدماج: وضع العينة النسيجية (بعد إتمام خطوات المعالجة في قالب يحتوي على نفس المادة المستخدمة في الإشباع (وغالبا ما يكون شمع البرافين) مما تكسب العينة دعامة (شكل ثابت) للحصول على مقاطع نسيجية رقيقة.

طريقة الطمر (الإدماج):

الخطوة الأولى:

1. يصب الشمع الذائب في قالب الطمر على أن يكون عمق القالب ضعف سمك العينة على الأقل وأن لا يزيد حجم الشمع المصبوب على النصف.

الخطوة الثانية:

2. تفتح الكبسولة المحتوية على العينة (بعد انتهاء مراحل المعالجة) تأخذ العينة بواسطة ملاقط خاصة (Forceps) وبرفق حتى لا تنكمش العينة ويجب أن تكون الملاقط ساخنة حتى لا يؤدي إلى صعوبة في عملية الطمر وتوضع في قالب الطمر المحتوى على الشمع الذائب بالطريقة المناسبة مع مراعاة ما يلي:

أ. أخذ الإحتياط اللازم لمنع حدوث أي تلوث للعينات وذلك بالتأكد من عدم وجود بقايا من عينات أخرى على الملقط أو على القاعدة التي توضع عليها العينات في جهاز الطمر.

ب. وضع العينات وخاصة الصغيرة منها بوضع مستوى أفقي بحيث تكون جميع العينات أو جميع أجزاء العينة على مستوى أفقي واحد وقـدر الإمكـان بحيث يسهل عملية التقليم (Trimming) ويقلل احتمال حدوث أخطاء في مرحلة القطع (Section) ويمكن أن تتم هذه العملية بشكل صحيح وذلك بضغط العينة بالملقط وهو مفتوح ثلث فتحة على جميع أجزاء العينة أو ضغط العينة على القاعدة الموضوعة عليها في جهاز الطمر قبل وضعها في قالب الشمع أما بالنسبة للعينات الصغيرة فيسخن القالب قبل صب الشمع لكي يبقى الشمع ذائبا عند وضع العينات بحيث نتمكن من وضع جميع القطع الصغيرة بنفس المستوى ومن ثم نثبت بالملقط واحـدة بعـد الأخرى بعد نقل القالب من المنطقة الساخنة إلى المنطقة العازلة ويجب أن تكون القطع الصغيرة على خط موازي لمحور القطع.

ج. وضع العينات الصغيرة والتي تكون خيطية الشكل والمأخوذة على شـكل خزعة أبرية (Needle Bx) مثل خزعة من الكبد أو خزعة من الكليـة أو خزعة من نخاع العظم بشكل أفقي وموازي لمحور القطـع لكـي يقلـل إحتمال حدوث ثنيات (Folding) أثناء عملية القطع ووضع المقاطع على الشرائح لتسهيل عملية تشخيص الشرائح.

د. وضع العينات الأنبوبية الشكل (Cord Like) مثل عينة من قناة فالوب أو عينة من وعاء دموي (شريان أو وريد) أو عينـة مـن الحبـل السـري (Umbilical Cord) أو عينة من الحالب (Ureter) على وجه القطـع (على التجويف) بحيث يظهر المقطع تركيب الجدار (الإطار) للعينة ويظهر كذلك التجويف وذلك للحصول على تشخيص صحيح.

هـ. يجب أن تكون العينات في وسط القالب وأن يكون الشمع محيط بها من جميع الجوانب وحجم القالب يجب أن يكون مناسب مع حجم العينة.

ملاحظة:

درجة حرارة الملاقط المستخدمة في عملية الطمر يجب ان تكون ساخنة كي لا تسمح تجمد الشمع عليها ولكن في نفس الوقت أن لا تكون درجة حرارة الملاقط عالية جدا بحيث تسبب في احتراق الشمع.

الخطوة الثالثة:

3. بعد وضع العينة بالطريقة الصحيحة والمناسبة يسخن الملقط أو الملاقط لدرجة مناسبة ثم تثبت العينة برفق في قاع القالب.

الخطوة الرابعة:

4. توضع قاعدة الكبسولة الموضوع فيها العينة خلال المعالجة كغطاء للقالب وهذه الكبسولة تحمل رقم العينة أو يوضع غطاء للقالب مناسب ثم يصب شمع البرافين لملئ القالب والغطاء ثم توضع الورقة التي تحمل رقم العينة (Lable) على جانب الغطاء من الداخل ويجب أن تكون عملية صب الشمع بطيئة نسبيا لكي لا تطفو العينة أو العينات في الشمع فتضيع في القالب خاصة إذا كانت العينة صغيرة جدا.

الخطوة الخامسة:

5. يوضع القالب على سطح بارد (بعض أجهزة الطمر لها جزء يعمل للتبريد) حتى يجمد الشمع ويفضل التبريد السريع لتقليل حجم بلورات الشمع لسهولة القطع ثم يترع القالب المعدني أو الورقي مهما كان نوعه للحصول على قالب البرافين المحتوى على العينة والذي يحمل رقم العينة وبذلك تتم هذه المرحلة وتكون العينة جاهزة للمرحلة اللاحقة.

أنواع القوالب المستخدمة في الطمر (الإدماج):

1. القوالب المعدنية: وهي عدة أنواع منها:

أ. قوالب تتكون من قطعتين على شكل حرف L توضع بجانب بعضها البعض لتشكل مربع □ وبعد أن يجمد الشمع يفك القالب المعدني ويتم الحصول على قالب الشمع المحتوى على العينة النسيجية.

ب. قوالب تتكون من قطعتين إحداهما تشكل القاعدة والأخرى تشكل الغطاء وتكون ذات عدة أحجام حيث يصب الشمع في القاعدة وبعد وضع العينة بوضع الغطاء ويكمل صب الشمع حتى يمتلئ القالب ثم يوضع الـ (Lable) وبعد أن يجمد القالب يفك الغطاء عن القاعدة ثم يتم الحصول على قالب الشمع المحتوى على العينة.

2. القوالب التي تتكون من قاعدة معدنية وأغطية بلاستيكية، وتكون القاعدة ذات عدة أحجام وتسمى (Molds) حيث يصب الشمع في القاعدة ثم توضع العينة وبعدها يوضع الغطاء البلاستيكي ثم يصب الشمع لملىء القالب وبعد أن يجمد الشمع بفك القالب للحصول على قالب الشمع حيث تكون القطعة البلاستيكية (الغطاء) جزء من قالب الشمع ويحمل الغطاء رقم العينة وغالبا ما يكون الغطاء البلاستيكي قاعدة الكبسولة الموضوع فيها العينة خلال مرحلة المعالجة وهناك أنواع مختلفة من الأغطية البلاستيكية.

3. قوالب بلاستيكية وتكون على شكل مجموعة مثل قوالب الثلج حيث يتم صب الشمع المنصهر فيها واحدة بعد الأخرى ثم توضع العينات فيها على التتابع ثم يصب الشمع لملىء القوالب وبعد التبريد تفك القوالب للحصول على قوالب شمع البرافين المحتوية على العينات.

4. القوالب الورقية: وهي قوالب مصنوعة من الورق الأملس لمنع التصاق الشمع بها وتستعمل على نطاق محدود.

ملاحظات عامة على عملية الإدماج (الطمر):

1. يجب صب شمع البرافين السائل بشكل متصل لتجنب تكون فقاعات هـــواء في القوالب.
2. يجب أن تتم عملية الطمر للعينة الواحدة بسرعة وبتتابع حتى لا تتكون طبقـلت غير متجانسة من الشمع في القالب لمنع تكسر القالب خلال القطع.
3. يجب تبريد القوالب بوضعها على صفيحة تبريد وليس وضعها في ماء بـــارد أو في ثلاجة لمنع تشقق القوالب الشمعية وعدم تكون بلـــورات شمعيـــة كبـــيرة الحجم.
4. لمنع التصاق الشمع في القوالب المعدنية ولسهولة نزع قوالب الشمع منها يمكن دهن قالب المعدن بمادة مثل الجلسرين أو رشها بمادة عازلة.
5. يفضل أن يكون غطاء القالب من البلاستيك (وغالبا ما تكون قاعدة الكبسولة الموضوع فيها العينات) ويكون الغطاء على شكل حلقة مربعة أو مســــــتطيلة (Ring) وذلك للمزايا التالية:

أ. يمكن كتابة رقم العينة على الغطاء البلاستيكي بسهولة ويبقــــى الرقم ثابت مع الزمن حيث يقلل احتمال فقدان الرقم أو صعوبــة قراءته مع الزمن.

ب. تكون الكبسولة أو الغطاء الحلقي أقوى وأصلب من شمع الـــبرافين مما يسهل عملية القطع ويقلل احتمال تكسر القــــالب خـــلال القطع.

6. يفضل أن يكون قاعدة القالب من المعدن المعروف بـــــــ (Mold) للمزايـــا التالية:

أ. لا تصدأ مع الزمن ولا تتأثر بعوامل التسخين والتبريد.

ب. استخدام القاعدة بشكل متكرر ودائم.

ج. سهولة نزع قوالب الشمع منها بعد التبريد.

د. وجود أحجام مختلفة منها حيث يمكن إختيار حجـــــم القـــاعدة ليتناسب مع حجم العينة.

هـــ. كون أطراف القوالب المعدنية متوازية يمكن الحصول على قوالـــب شمعية متوازية الأطراف مما يسهل عملية التقليم والقطع.

7. لحفظ العينة لفترة طويلة وللحصول على مقاطع جيدة بعد فترات زمنية طويلـة يفضل وضعها في قالب من الشمع أفضل من حفظها بأي مثبت معروف.

الفصل الخامس

المرحلة الخامسة عمل المقاطع النسيجية الرقيقه Microtomy

مقدمة:

إن أول آلة استخدمت لعمل مقاطع نسيجية رقيقة كانت سنة 1770م بواسطة العالم كيومنج (Cumming) وكانت هذه الآلة ذات يد واحدة أما أول آلة قطع ذات يدين اثنتين فكانت عام 1835م وقد طورها العالم (Dritchard) درنشارد وكانت تسمى آلة القطع أما أول من استخدم اسم Microtome للدلالة على آلة القطع فكان العالم Chevatier عام 1839م وفيما يتعلق بأجهزة القطع فكان جهاز القطع الإنزلاقي هو أول أجهزة القطع استخداما وكان ذلك عام 1798م أما جهاز القطع الدوار فقد استخدم للمرة الأولى عام 1883م وفيما يتعلق بجهاز القطع المجمد (Freezing Microtome) فقد استخدم للمرة الأولى عام 1901م تعتبر المراحل السابقة لمرحلة القطع مراحل تمهيدية لها حيث أن مرور العينات من مرحلة التثبيت ثم مرحلة المعاينة ثم مرحلة المعالجة ثم مرحلة الطمر على الترتيب يكسب العينات في النهاية صلابة داخلية وصلابة خارجية كافية للتمكن من عمل مقاطع نسيجية رقيقة من هذه العينات حيث تتم عملية القطع هذه باستخدام أجهزة القطع المعروفة باسم Microtome.

أنواع أجهزة القطع المستخدمة:

1. جهاز القطع الدوار Rotary Microtome.
2. جهاز القطع الإنزلاقي Sliding Microtome.
3. جهاز القطع الهزاز Rocking Microtome.
4. جهاز القطع فوق الدقيق Ultra Microtome.
5. جهاز القطع المجمد Freezing Microtome.
6. جهاز القطع ذو السكين الإهتزازية Vibrotome.

أولاً: جهاز القطع الدوار Rotary Microtome:

ومثال عليه جهاز القطع من نوع Aomicrotome:

تركيب الجهاز: يتكون جهاز القطع الدوار من نوع (Aomicrotome) من الأجزاء التالية:

1. ذراع القطع وتكون على جانب الجهاز وبتحريكها مع اتجاه عقارب الساعة يرتفع حامل القالب معها بمستوى عمودي على سكين القطع مما ينتج عنه الحصول على المقاطع النسيجية ولا يجوز تحريك هذه الذراع بالإتجاه المعاكس.
2. مؤشر وضابط السمك إذبة يتم التحكم بسمك القطع.
3. جهاز الدفع ويتكون من:

   أ. العجلة المسننة والتي تتحرك بعد حركة ذراع القطع.

   ب. المحور المسنن والذي يتحرك مع حركة العجلة المسننة.

   ج. قطعة الدفع والتي تدفع حامل القالب وتكون مركبة على المحور المسنن على شكل مسمار.

4. حامل القالب ويتحرك بالمستوى الأفقي (إلى الأمام وإلى الخلف) وبالمستوى العمودي للأعلى والأسفل.

5. ذراع التحكم والتي تتحكم بوضع حامل القالب وحركته وأهميتها ضبط موقع القالب بالنسبة لسكين القطع.

6. حامل السكين وهناك نوعين النوع الأول حامل سكين دائمة الإستعمال والنوع الثاني حامل السكين التي تستخدم لمرة واحدة (Disposable).

7. القاعدة التي تثبت عليها جميع أجزاء الجهاز.

8. الغطاء المعدني والذي يغطى أجزاءه الداخلية ويحميه من الغبار والأوساخ.

مبدأ عمله:

يعتمد مبدأ عمل هذا الجهاز على الحركة الدائرية للمسننات ولهذا سمي جهاز القطع الدوار ويتلخص مبدأ عمله الجهاز بالنقاط التالية:

1. عند تحريك ذراع القطع باتجاه عقارب الساعة تتحرك العجلة المسننة بنفس الإتجاه وبمقدار يعتمد على السمك الذي يشير له ضابط السمك.

2. حركة العجلة المسننة يتحرك معها المحور المسنن وبنسبة ثابتة وبتناسب طردي ويشير لها حركة الذراع الثانية (ذراع ضبط القالب).

3. حركة المحور المسنن ومعها حركة ذراع ضبط القالب يتحرك معها قطعة الدفع (على شكل مسمار) إلى اليسار على المحور.

4. حركة قطعة الدفع إلى اليسار ينتج عنها دفع حامل القالب إلى الأمام وبمقدار يعتمد أساسا على السمك الذي يشير لها مؤشر ضبط السمك.

5. لضبط القالب من حيث الموقع بالنسبة لسكين القطع نستعمل ذراع ضبط القالب (الذراع الثانية) حيث أنها تتحرك بالإتجاهين إلى الأمام وإلى الخلف مع العلم أن حامل القالب يتحرك بعكس اتجاه حركتها وأن اللفه الكاملة كلها حوالي 250 ميكرون إلى $\frac{1}{4}$ ملم.

6. مع حركة الذراع الأول (ذراع القطع) يرتفع حامل القالب على سكين القطع ثم يمر عليها ثم ينخفض عنها مما ينتج عنه الحصول على المقاطع بالإضافة إلى عملية تقليم القالب حسب السمك المطلوب.

مميزات جهاز القطع الدوار:

لهذا الجهاز حسنات وسيئات نذكر منها:

حسناته:

1. يمكن من الحصول على مقاطع نسيجية دقيقة وجيدة.
2. يمكن من الحصول على مقاطع نسيجية متصلة على شكل شريط.
3. لأن السكين ثابتة والقالب متحرك يكون القطع أسهل وأكثر أمانا لمن يقوم بعملية القطع.
4. أجزاءه الداخلية مغطاة مما يمنع أو يقلل من دخول الغبار والأوساخ إليها مما يوفر لها الحماية.

مساوئه:

- وزنه ثقيل مما يصعب معه تحريكه وحمله.
- صعوبة ضبط زوايا القطع (زاوية ميل السكين وزاوية الخلوص) لأن حامل القالب واسع الحركة ووجود عدة ضوابط له.

استخداماته:

يستخدم جهاز القطع الدوار في معظم المختبرات الطبية والتعليمية وهو من أكثر أجهزة القطع انتشارا وغالبا ما يستخدم في عملية القطع باستخدام قوالب من شمع البرافين أما استخدامه في أجهزة القطع الجليدي فهو محدود بسبب ثقله الكبير وصعوبة تنظيفه هذا ويمكن تركيب حامل لسكاكين تستعمل لمرة واحدة Disposable Blade .

ثانيا: جهاز القطع الهزاز Rocking microtome:

تركيبه: هناك تشابه كبير بين جهاز القطع الدوار وجهاز القطع الهزاز من حيث التركيب ومبدأ العمل ولا داعي لذكر الأجزاء المتشابه وأوجه الشبه من مبدأ العمل وسنكتفي بذكر الأجزاء المختلفة والإختلافات.

أوجه الإختلاف:

1. الغطاء المعدني غير موجود وبالتالي أجزاءه الداخلية تكون مكشوفة.
2. وجود الزنبرك الهزاز والذي يهتز بحركة ذراع القطع.

مبدأ عمله:

يشبه في عمله جهاز القطع الدوار إلا أن اندفاع حامل القالب ينتج عن إهتزاز الزنبرك وليس عن دوران عجلة مسننة.

حسناته:

1. الجهاز خفيف الوزن سهل الحركة والتنظيف.
2. لأنه خفيف الوزن فإنه يفضل استخدامه في أجهزة القطع الجليدي.
3. حامل القالب ثابت من موقع معين وبالتالي فإن عملية ضبط زوايا القطع وهي زاوية ميل السكين وزاوية الخلوص تكون أسهل وتعتمد فقط على حامل السكين.
4. سهل الإستعمال بالنسبة لأجهزة القطع الأخرى وبالتالي يفضل استخدامه لأغراض المختبرات التعليمية.

سيئاته:

- أجزاءه الداخلية مكشوفة وبالتالي تكون عرضه لبقايا الشمع والأوساخ والغبار.

- لأنه يعتمد على مبدأ الحركة الإهتزازية فمن الصعب الحصول على مقاطع نسيجية على شكل شريط.
- لأنه خفيف الوزن لا يصلح لقطع العينات الصلبة جدا أو القاسية كما أنه لا يصلح لقطع القوالب الكبيرة.

ثالثا: جهاز القطع الإنزلاقي Sliding Microtome:

يعتبر جهاز القطع الإنزلاقي من أقدم أجهزة القطع من حيث الاستخدام للحصول على مقاطع نسيجية رقيقة ولعدم وجود هذا الجهاز سنكتفي بذكر مميزاته بشكل عام وهي:

1. يكون القالب ثابت وسكين القطع هي المتحركة بعكس أجهزة القطع السابقة ولهذا سمي بجهاز القطع الإنزلاقي وأن السكين تنزلق على العينة.
2. يستخدم هذا النوع في أغراض الأبحاث ولدراسة مقاطع كبيرة من أعضاء كاملة ولكن نادرا ما يستخدم للأغراض العادية أو لغرض التعليم.
3. يمكن قطع العينات النسيجية المشبعة والمطمورة في البلاستيك والسيلودين أو الجلاتين كما يمكن قطع العينات المشبعة بشمع البرافين أيضا ولكنه يستخدم بشكل خاص للعينات المشبعة والمطمورة بمادة نيتروسليولوز.
4. الجهاز كبير الحجم وثقيل الوزن والعمل عليه يحتاج إلى مهارة كبيرة لذلك لا يفضل استخدامه للأغراض التعليمية أو التشخيصية.

5. كونه ثقيل الوزن يفضل استخدامه للعينات الكبيرة والقاسية مثل العظام والأسنان حتى ولو لم تكن متروعة الكلس إذا كانت مطمورة بالصمغ الصناعي (Resin).

6. من الصعب الحصول على مقاطع نسيجية متصلة (شريط) باستعمال هذا النوع إلا في حالة استخدام شمع البرافين.

رابعا: جهاز القطع الدقيق Ultra Microtome:

ويستعمل هذا الجهاز للحصول على مقاطع نسيجية رقيقة جدا تصل إلى 1 ميكرون أو أقل وذلك بهدف دراستها بالمجهر الالكتروني ولا يستعمل شمع البرافين لهذا الغرض ولا يستعمل هذا الجهاز في الأغراض التشخيصية العادية أو الأغراض التعليم.

خامسا: جهاز القطع الجليدي Freezing Microtome:

يختلف جهاز القطع الجليدي عن جهاز القطع العادي بأنه مزود بوسائل تبريد وقد تكون هذه الوسائل خارجية متصلة بجهاز القطع أو بوضع جهاز القطع نفسه في حجرة مبردة ضمن جهاز يعرف بإسم (Cryostate) وسنؤجل الحديث عنه بالتفصيل لموضوع القطع الجليدي (Frozen Section).

سادسا: جهاز القطع ذو السكين المتذبذبة Vibrotome:

ويتميز هذا الجهاز بما يلي:

1. سكين القطع تهتز بذبذبات عالية خلال عملية القطع قد تصل من 50-60 ذبذبة من الثانية ويعتمد ذلك على درجة صلابة العينة حيث تتناسب درجة الصلابة من الذبذبات تتناسب طردي.

2. تتم عملية القطع من وسط سائل حيث أن السكين تكون مغمورة والعينة في سائل خلال عملية القطع وهذا السائل قد يكون محلول ملحي Saline أو ماء مقطر أو محلول التثبيت.

3. يمكن الحصول على مقاطع نسيجية رقيقة من عينات مختلفة سواءا أكانت مثبتة أو غير مثبتة وحتى من عينات لم تمر بمراحل التحضير المعروفة وكذلك بدون أن تمر بعملية التجميد.

4. تتميز عملية القطع باستخدام هذا الجهاز بصعوبة الصاق المقاطع على الشريحة وبالتالي لابد من إستمال مادة لاصقة لتثبيت المقاطع على الشرائح.

5. يستفاد من هذا النوع من الأجهزة في الحصول على مقاطع بهدف دراسة الأنزيمات أو الدراسات الكيميائية على الأنسجة بشكل عام Histochemistry وذلك لأنه يمكن الحصول على مقاطع نسيجية دون أن تمر العينات بمراحل التثبيت أو التجميد أو المعالجة.

سكاكين القطع:

بغض النظر عن جهاز القطع المستخدم فإن سكاكين القطع المستخدمة من حيث النوع ودرجة حدة الحد القاطع لها تلعب دور أساس في عملية القطع بالإضافة إلى جهاز القطع ونوعه ومدى صلاحيته للعمل حيث أن وجود ثلمات أو خدوش في الحد القاطع للسكين يعطي مقاطع مثلمة متشققة أما إذا كان حد القطع غير ماض فإن ذلك يسبب صعوبة في عملية القطع ويسبب مشاكل كثيرة سيرد ذكرها في موضوع مشاكل القطع وتقسم السكاكين من حيث الإستعمال إلى نوعين:

أولا: سكاكين دائمة:

وتستخدم باستمرار وتكون مصنوعة من:

أ. المعدن غير قابل للصدأ على الغالب وتستعمل للتحضيرات المجهرية باستخدام شمع البرافين وتختلف من حيث الحجم والطول حيث يوجد سكاكين قطع من هذا النوع بأطوال وأحجام مختلفة أما من حيث الحد القاطع فتقسم إلى:

1. **سكاكين مقعرة الوجهين:** ويستخدم بشكل عام لعمل مقاطع نسيجية باستخدام شمع البرافين وتعطى مقاطع رقيقة جدا وجيدة.
2. **سكاكين مستوية مقعرة:** تستخدم في حالة استعمال قوالب من نيتروسليولوز ويكون القطع على الجهة المستوية من السكين وفي الوقت الحالي حلت سكاكين مستوية الوجهين محل هذه السكاكين.
3. **سكاكين مستوية الوجهين:** وتستعمل في جميع أجهزة القطع وفي مختلف الحالات (القطع المجمد) والقطع العادي باستخدام شمع البرافين ونيتروسليولوز كما تستخدم لقطع الأنسجة القاسية والطرية وكذلك في حالة استعمال الصمغ الصناعي (Resin) وتعتبر هذا النوع من السكاكين الأكثر استخداما من الناحية العملية.
4. **سكاكين تكون حافة القطع على شكل إزميل:** وتستعمل لقطع الأنسجة القاسية مثل العظام في الحيوانات والخشب في النباتات كما تستخدم في حالة استعمال البلاستيك كمادة للطمر.

ب. سكاكين مصنوعة من الماس وتستخدم في تحضيرات المجهر الإلكتروني.

ج. سكاكين مصنوعة من الزجاج وهي أيضا تستخدم في تحضيرات المجـــــهر الإلكتروني وتشبه السكاكين التي تستخدم لمرة واحـــدة Disposable من حيث الإستخدام.

ثانيا: سكاكين تستخدم لمرة واحدة (غير قابلة للشحذ) Disposable Blades:

وتستخدم حاليا على نطاق واسع وتتميز بإمكانية الحصول على مقـــاطع جيدة باستخدامها ولا تحتاج إلى شحذ.

مميزات هذه السكاكين:

حسناتها:

1. لا تحتاج إلى شحذ حيث يتم التخلص منها عندما يتلف الحد القـــاطع منها.
2. تعتبر إقتصادية وخاصة عند قطع عينات قاسية حيث أن التخلص مـــن السكين أوفر من إتلاف سكين دائمة غالية الثمن إذا لم ينفع معـــها الشحذ.
3. قصر طول السكين من هذا النوع بالنسبة للسكين الدائمة وهذا يعـــني أن طرفي حافة القطع من السكين غير بارزتين بالنسبة كحامل السكين مما يقلل من مخاطر الإصابة خلال العمل.

سيئاته:

- إحتمال اهتزاز السكين خلال القطـــع وارد وخاصـــة بالنســـبة للأنسجة الصلبة جدا أو القاسية مما يعطي مقطع مدرج (منـــاطق سميكة وأخرى رقيقة خلال المقطع نفسه) وذلك بسبب خفة وزن السكين.

ملاحظة:

هذه السكاكين مصنوعة من المعدن الذي لا يصدأ Stainless Steel أو معدن مغطى بطبقة Teflon ومن هنا يمكن استعمال هذا النوع في أجهزة القطع الجلدي لأنها غير قابلة للصدأ.

زوايا القطع والحد القاطع:

- **زاوية القطع:** هي الزاوية التي يمثلها ميل الحد القاطع من السكين من كلا الجانبين وتساوي تقريبا 14^0 من كل جانب.
- **زاوية ميل السكين:** هي الزاوية بين الحد القاطع للسكين والمحور الأفقي وتتناسب تناسب عكسي من زاوية الخلوص حيث أن مجموع زاوية ميل السكين وزاوية الخلوص يساوي تقريبا 90^0.

ملاحظة:

من المهم ضبط زاوية الخلوص بشكل جيد وذلك لأنه إذا كانت زاوية الخلوص كبيرة فإن ذلك يؤدي إلى التفاف المقاطع إلى أعلى أما إذا كانت زاوية الخلوص قليلة فإن ذلك يؤدي إلى التصاق المقاطع على القالب.

العناية بالسكين:

يجب العناية بالسكين وتنظيفها بعد الاستعمال دائما بقطنة مبللة بالزايلين بحيث يكون التنظيف من أسفل إلى أعلى بإتجاه الحد القاطع وليس العكس ووضع السكين في المكان المخصص لها في الصندوق أو العلبة الخاصة بها ويجب معاملة السكين دائما بحذر والتعامل معها بحذر أيضا.

شحذ السكاكين:

الطريقة القديمة: تتم عملية شحذ السكين على مرحلتين وحسب وضع السكين من حيث الجودة ومقدار ما لحقها من خدوش وتثلم وهما التسنين والصقل.

1. **التسنين "Honing"**: إذا كانت السكين مثلمة لدرجة تظهر هذه الثلمات بالعين المجردة فلا بد من القيام بعملية التسنين لها وذلك من أجل شحذها وتسوية الثلمات ويمكن أن تتم عملية التسنين بشكل يدوي وذلك باستخدام المسن اليدوي والمكون من حجر صخري مثل حجر الكاربوراندوم ويجب أن يتناسب حجم حجر المسن مع حجم السكين وطولها ويجب أن يكون الحجر رطبا خلال الاستعمال وذلك بإضافة الصابون والماء عليه خلال عملية التسنين مع مراعاة أن تتم عملية التسنين على الوجهين بالنسبة للحد القاطع للسكين 8-12 مرة لكل جهة وذلك حتى تختفي الثلمات والتشققات في السكين بشكل كلي وكامل.
2. **عملية الصقل "Stropping"**: وتتم عملية الصقل بعد التسنين وبعد أن تختفي النتوءات والثلمات المرئية في حد السكين يتم تنظيف الحد القاطع بشكل جيد من بقايا الصابون والماء والأوساخ وبعدها تتم عملية الصقل باستخدام مشحذ جلدي لصقل السكين ويجب إضافة الزيت على المشحذ خلال عملية الصقل وأن يكون الصقل على الوجهين وبعدها يتم فحص السكين بالمجهر التشريحي بعد تنظيفها بشكل جيد وتعتبر عملية الشحذ جيدة إذا اختفت الثلمات والنتوءات من على الحد القاطع للسكين خلال فحصها بالمجهر التشريحي.

الطريقة الحديثة: ويتم التسنين والصقل على صفحة واحدة مصنوعة من المعدن أو الزجاج بعد إضافة مواد على شكل حبيبات على سطح الصفحة حيث يتراوح حجم هذه الحبيبات من أجزاء الميكرون إلى عشرات الميكرون ومن هذه المواد:

أ. **غبار الماس:** حيث يتراوح حجم الدقائق من 0.25 ميكرون إلى 50ميكرون.

ب. **دقائق الكاربوراندوم:** ويتراوح حجم الدقائق بين 7-20ميكرون.

ج. **أكسيد الألومنيوم:** ويوجد منها دقائق بصغر يصل إلى 0.1ميكرون.

د. **أكسيد المغنسيوم** هـ. **أكسيد الكروميوم.**

وعند استخدام أي من هذه المواد يجب إضافة مادة ترطيب لتسهيل عملية الشحذ ويجب مراعاة استخدام الدقائق ذات الحجم الكبير لعملية التسنين والدقائق الصغيرة لعملية الصقل أما فيما يتعلق بمواد الترطيب فقد تكون محاليل مائية أو غير مائيةمثل الزيوت التي لا تذوب في الماء وتتم عملية الشحذ الحديثة في الوقت الحالي بطريقتين:

أولا: الطريقة اليدوية: وتتم كالتالي:

1. توضع المادة بحيث يكون حجم الحبيبات أو الدقائق مناسبا مع العملية التي ستتم أي أن يكون حجم الدقائق كبير إذا كانت المطلوب أو المراد عمل التسنين وأن يكون حجم الدقائق صغير إذا كان المراد عمل الصقل على الصينية.

2. يضاف كمية قليلة من مادة الترطيب مع الأخذ بعين الإعتبار ما إذا كانت هذه المادة متجانسة مع الماء أم لا وذلك يعتمد على المادة المستخدمة للشحذ.
3. تمزج مادة الشحذ مع مادة الترطيب بطرف الأصبع فوق الصينية بكشل جيد وتوزع بانتظام على جميع أجزاء المشحذ (الصينية).
4. تتم عملية التسنين (إذا كانت ضرورية إي إذا كانت الثلمات ظاهرة للعين المجردة) وبعدها تنظف السكين بقطن مبلل بالزايلين وإذا كان الحد القاطع جيدا ويخلو من الثلمات بالنظر بالعين المجردة تزال مادة التسنين ويوضع بدلا منها مادة الصقل والزيت أو مادة الترطيب حيث يكون حجم الدقائق أصغر وتبدأ عملية الصقل بنفس الطريقة مع مراعاة قلب السكين خلال عملية الشحذ.
5. تنظف السكين أيضا بقطن مبلل بالزايلين ثم تفحص بالمجهر التشريحي لمعرفة مدى حدتها وذلك على تكبير 60 مرة فإذا اختفت النتوءات بشكل نهائي فهذا يعني أن عملية الشحذ جيدة ويتحكم بعملية الشحذ عدة عوامل هي:
   أ. حافة السكين قبل الشحذ.
   ب. المادة المستخدمة في الشحذ.
   ج. الخبرة العملية لمن يقوم بعملية الشحذ.

ثانيا: الطريقة الآلية: وذلك باستخدام جهاز الشحذ الآلي (Auto Sharp).

تركيب جهاز الشحذ الآلي:

يتكون جهاز الشحذ الآلي من عدة أجزاء أهمها:

1. **الرافعة وحامل السكين:** حيث يتم تركيب السكين على الحامل المتصل بالرافعة والتي بدورها تقوم بقلب السكين لكي يتم شحذها على الوجهين.
2. **صينية الشحذ:** ويتكون سطحها من مادة السليكا ويضاف عليها مادة الشحذ حسب الهدف المطلوب إذا كان التسنين أو الصقل، ولكن في الغالب ومن الناحية العملية فغالبا ما تكون السكاكين ذات ثلمات بسيطة مرئية بعد الإستعمال وبالتالي يمكن عمل التسنين والصقل في وقت واحد وذلك بمزج كميتين متساويتين من مادتين مختلفتين في حجم حبيباتها مع إضافة مادة الترطيب أو إضافة مادة خشنة للتسنين ثم مادة أقل خشونة للصقل.
3. جهاز ضبط زاوية ميل السكين.
4. جهاز التوقيت لضبط البداية والوقت اللازم للشحذ والوقت اللازم لقلب السكين لكي تشحذ على الوجهين.
5. مفتاح التشغيل للجهاز.

طريقة تشغيل الجهاز وطريقة عمله:

تتم عملية الشحذ على الجهاز الآلي كالتالي:

1. وضع مادة أو مواد الشحذ على الصينيه ويفضل من الناحية العملية مزج كميتين متساويتين ويفضل استخدام مادة ذات حبيبات بحجم 5 ميكرون مع مادة ذات حبيبات بحجم 10 ميكرون.
2. تمزج الكميتين بشكل جيد بطرف الأصبع ويضاف خلال ذلك زيت أو مادة ترطيب وتوزع على سطح صينية الشحذ بشكل جيد.
3. تركب السكين على الحامل ويركب الحامل على الرافعة.

4. تضبط زاوية ميل السكين ويفضل الشحذ على 30^0.

5. يضبط الوقت المطلوب ويعتمد على وضع السكين.

6. يضغط على زر التشغيل وتبدأ عملية الشحذ.

7. بعد الإنتهاء من العملية يتم حل السكين والحامل من الرافعة ثم تحل السكين وتنظف بقطنة مبللة بالزايلين بشكل جيد وتفحص السكين بالمجهر التشريحي.

8. إطفاء جهاز الشحذ وتغطيته.

مميزات عملية الشحذ الآلي:

1. يوفر الوقت والجهد.

2. يعطي حافة قطع حادة من الوجهين وذلك لأنه يقلب السكين خلال الشحذ.

3. يقلل من مخاطر عملية الشحذ على من يقوم بها أي أكثر أمانا.

الناحية العملية في القطع:

أولا: التقليم: Trimming:

التقليم: هو تهذيب العينة أو القالب المحتوى على العينة النسيجية وذلك بإزالة الشمع الزائد عن سطح العينة لإظهارها بمستوى واحد بهدف الحصول على مقطع نسيجي.

الأسباب الموجبة لعملية التقليم:

1. إزالة الشمع الزائد على سطح العينة في القالب.
2. تهذيب العينة النسيجية في القالب بحيث تصبح على مستوى أفقي واحد تماما.
3. كشط جزء من سطح العينة للحصول على مقطع أو مقاطع متوسطة في العينة وليست سطحية وشاملة لجميع أجزاءها.

ملاحظة:

وهناك تقليم من نوع آخر وهو تهذيب القالب المحتوي على العينة من الجانبين المتوازيين والمعروفين بحافتي القطع بحيث تصبح هاتان الحافتان متوازيين.

طريقة التقليم:

بعد تقليم حافتي القالب إذا لزم ذلك كما يلي:

1. تفقد جهاز القطع ومدى صلاحية أجزاءه للعمل.
2. تركيب القالب بشكل صحيح على حامل القالب وبوضع يناسب طبيعة العينة مع الآخذ بعين الإعتبار أن يكون سطح القالب الخلفي موازي تماما للحامل وأن يكون حافتي القطع للقالب موازية تماما لسكين القطع.
3. تثبيت القالب بشكل جيد بعد التأكد من ثبات حامل القالب في موقعه الصحيح.
4. ضبط القالب بحيث يكون يلامس سطح القالب الحد القاطع للسكين باستخدام ذراع ضبط القالب من جهاز القطع مع الآخذ بعين الإعتبار مبدأ عمل جهاز القطع ونوعه.
5. ضبط السمك على 15ميكرون أو أكثر قليلا.
6. عمل التقليم بتحريك الذراع المحركة لحامل القالب (ذراع القطع).
7. بعد الإنتهاء من عملية التقليم يتم فك القالب وتنظيف قاعدة حامل القالب في حالة وجود أي بقايا شمع عليها ويجب تنظيفها بين كل قالب وآخر لأن تراكم بقايا الشمع هذه تغير زاوية القطع للقوالب وبالتالي يستوجب ذلك إعادة التقليم مرة أخرى لبعض القوالب.
8. بعد ذلك يتم وضع القوالب بعد تقليمها على الثلج المبروش لتبريدها وتحضيرها وتجهيزها لعملية القطع حيث أن عملية التبريد تزيد من صلابة

الشمع والعينة وتمكن من الحصول على مقاطع رقيقة وجيدة وخاصة في الحالات التالية:

أ. العينات الطرية بدرجة كبيرة ومنها العينات الدهنية حيث أن عملية التبريد تزيد من صلابة الدهون وبالتالي يمكن الحصول على مقاطع جيدة تماما.

ب. العينات المحتوية على دم متخثر وبالتالي يمكن عمل مقاطع جيدة نوعا ما.

ج. عينات الغدة الدرقية أو الحويصلات حيث أن هذه العينات تكون على شكل حويصلات أو تحتوي على حويصلات مليئة بسائل أو محاليل غروية وتبريدها يزيدها صلابة مما يسهل عملية القطع ويمكن من الحصول على مقاطع رقيقة.

د. العينات القاسية المحتوية على الكيراتين أو غيره فإن عملية التبريد تزيد من صلابة الشمع بحيث يكون هناك تجانس نوعا ما مع صلابة العينة وبالتالي تسهل من عملية القطع وتمكن من الحصول على مقاطع جيدة، في حالة العينات القاسية نتيجة لتكلس أو الكيراتين- يمكن تطرية العينة بوضع القالب على محلول مخفف من حامض الهيدروكلوريك تركيز 10% لمدة ربع ساعة إلى نصف ساعة ثم توضع القوالب على الثلج فتكون جاهزة للقطع.

ثانيا: القطع:

الحصول على مقاطع نسيجية رقيقة يتراوح سمكها بين 3-7 ميكرون باستخدام جهاز القطع Microtome.

بعد أن تنتهي عملية التقليم بشكل كامل وبعد تبريد القوالب المحتوية على العينات بشكل جيد تتم عملية القطع كالتالي:

1. وضع سكين خاصة بالقطع بدل سكين التقليم.
2. تركيب القالب بنفس الوضع الذي تم عليه التقليم وبدون أي تغير.
3. ضبط السمك حسب المطلوب وغالبا من 3-7 ميكرون وذلك يعمد على طبيعة العينة وعلى سبيل المثال لعمل مقاطع من خزعة نسيجية من الكلية لضبط السمك على 3 ميكرون ولمعظم العينات الأخرى يفضل ضبط السمك على 4 أو 5 ميكرون.
4. ضبط القالب بالنسبة لسكين القطع أو الحد القاطع لها بحيث يلامس سطح القالب الحد القاطع للسكين دون أن يأخذ من سطح القالب شيء باستخدام ذراع ضبط القالب وذراع القطع وتتم بعد ضبط حامل القالب وحامل السكين وميل السكين.
5. عمل المقاطع النسيجية وبشكل متتابع ويفضل أن تكون على شكل شريط متصل باستخدام ذراع القطع فقط ويجب أن تكون سرعة القطع حسب طبيعة العينة فبعض العينات مثل عينات من الدماغ أو العقد اللمفاوية أو الطحال أو العينات التي تحتوي على كمية من الدم المتخثر فيكون القطع بطيء بينما يكون القطع أسرع إذا كان المطلوب الحصول على شريط من المقاطع المتصلة وخاصة بالنسبة للخزنات الصغيرة (Small Biopsy) مثل خزعة من المعدة (Gastric Bx) وغيرها ومهما كانت سرعة القطع فيجب أن تدار ذراع القطع دون لمس أو مس الحد القاطع للسكين بالملقط كي لا يخدشها ويسبب في تثلمها وحمل تلك المقاطع بشكل جيد ووضعها على كحول إيثيلي بتركيز 30% ويفضل أن يكون وجه القطع للمقاطع (الوجه الأملس اللماع) على الكحول وأهمية ذلك فرد المقاطع ومنع إنثناءها.

ثالثا: تحميل المقاطع النسيجية على شرائح Mounting:

بعد فرد المقاطع النسيجية على الكحول الإيثيلي يتم ما يلي:

1. حمل المقاطع النسيجية عن الكحول بواسطة شريحة بحيث تدخل الشريحة تحت المقاطع بشكل مائل وبحيث يكون سطح الشريحة موازي لطرف المقطع الأول وتقربها حتى يلامس طرف المقطع ثم تسحب الشريحة بالإتجاه المعاكس وببطء إلى الأعلى وبشكل مائل أيضا.
2. وضع المقاطع النسيجية من على الشريحة في حمام مائي بحيث تدخل الشريحة في الحمام المائي وبشكل مائل أيضا ونسحبها للخلف وبشكل مائل كذلك بحيث تكون حرارة الماء في الحمام المائي 45^{0}م تقريبا أو أقل من درجة انصهار الشمع بـ 10^{0}م ونلاحظ أن المقاطع تفرد في الماء وبشكل سريع بسبب انتشار الكحول من تحت سطح المقاطع وبسرعة في الماء الساخن مما يعطي مقاطع مسطحة وحالة من الثبات ويقال أن تسطح المقاطع ناتج عن الماء الساخن الحمام حيث يعمل على تطرية الشمع في المقاطع بشكل تدريجي يسمح بتسطح تلك المقاطع بحيث يصبح المقطع مشدود من جميع الاتجاهات وبالتالي يعطي مقاطع واضحة بدون أي إنثناءات أو التفاف فيها ويمكن إضافة القليل من مواد التعقيم إلى الحمام المائي مما يزيد من عملية فرد المقاطع وهناك رأي آخر يقول أن خاصية التوتر السطحي للماء هي التي تعمل على فرد المقاطع.
3. كتابة رقم العينة على الشريحة وطريقة كتابة الرقم تعتمد على نوع الشريحة حيث أن هناك شرائح يمكن الكتابة على طرفها بقلم رصاص أو قلم حبر صيني أما معظم الشرائح فيتم كتابة الرقم بواسطة أقلام خاصة ذات رأس ماسي تسمى (Diamond pincel) وأهمية كتابة الرقم على الشريحة تكمن في معرفة رقم العينة بالإضافة إلى معرفة الجهة الموجود عليها المقطع النسيجي.

4. وضع مادة لاصقة على الشريحة إذا لزم الأمر لأن بعض العينات قـد تسـقط مقاطعها خلال الصبغة وبالتالي تحتاج إلى مادة لاصقة على الشـريحة وذلـك لتثبيت تلك المقاطع ومنع سقوطها ومن الأمثلة على هذه العينات عينات العظم والعينات المحتوية على كمية من الدم المتخثر بالإضافة إلى العينات القاسـية أو العينات التي تكون على شكل حويصلات (Cysts) ومثال على المواد اللاصقة "محلول ماير" الذي يتكون كالتالي:

محلول (أ) مسحوق البيومين 5غم و0.05 غم كلوريـد الصوديـوم في 100مل ماء مقطر. محلول (ب) 50 مل جلسرين/ يضاف 50 مل مـن محلول (أ) إلى 50 مل من محلول (ب) وتمزج جيـدا ثم ترشـح بـورق الترشيح ويضاف إليها 1 غم ثايمول كمادة حافظة.

5. تحمل المقاطع على الشرائح من الحمام المائي بحيث يتم إنزال الشريحة بشـكل عمودي وتقريبها حتى تلامس طرف المقطـع أو المقطـع الأول في الشـريط وبشكل موازي (سطح الشريحة موازية لطرف المقطع) ثم ترفع الشريحة بحيـث يكون المقطع في موقع مناسب على أن تترك الجزء العلوي من الشريحة لوضـع ورقة تحمل رقم الشريحة (Lable).
6. وضع الشرائح في حامل خاص للشرائح وبشكل مرتب حتى تتم عملية القطـع لجميع العينات أو حتى يمتليء الحامل مع الأخذ بعين الإعتبار وضع الشـرائح التي تحمل مقاطع نسيجية والمراد صباغتها بصبغات خاصة في حامل آخر.

رابعا: تجفيف الشرائح Drying:

بعد الإنتهاء من عملية القطع بشكل كامل يجب فـك سـكين القطـع وتنظيفها ووضعها في المكان المخصص لها إذا كانت من السـكاكين المسـتعملة باستمرار أو التخلص منها إذا كانت من النوع الـذي يسـتخدم لمـرة واحـدة

(Disposable) وأصبحت مثلمة وتنظيف جهاز القطع جيدا ووضع الشـــوائح في مجفف (Drier) أو فرن سواءا أكانت الخطوة أو المرحلة اللاحقة للصباغة مباشـــرة أو بعد فترة معينة أو في وقت لاحق أو تم الإكتفاء بمقاطع غير مصبوغة لهدف آخر مثل شحنها إلى جهة أخرى غير مصبوغة أو إستعمال بعض الشرائح لضبط بعـــض الصبغات (Controles) ويجب أن تكون درجة الحرارة مناسبة مع نوع الشـــــمع المستخدم وأن تكون أعلى من درجة انصهار الشمع بخمس درجات على الأقـــــل ولمدة حوالي ساعة من الزمن ويمكن رفع درجة الحرارة أكثر من ذلك لتقليل الوقت اللازم للتجفيف وهناك آراء مختلفة حول درجة الحرارة المناسبة للتجفيف منها:

1. التجفيف على درجة حرارة 37^0م ويحتاج من 16-24 ساعة وهـــذه قد تكون خاصة بدراسة الأنزيمات.
2. التجفيف على درجة حرارة 45-50^0م ويحتاج ساعتين أو أكثر.
3. التجفيف على درجة حرارة 55 – 60^0م ويحتاج من 30-60 دقيقة.
4. التجفيف على درجة أكثر من 60^0م ويحتاج إلى 20 – 30^0م دقيقة.

ملاحظة:

في حالة التجفيف على درجة حرارة أقل من 60^0م يجب وضـــــع مـــادة لاصقة على الشرائح كي لا تسقط المقاطع النسيجية عنها ويجب أن يكون إنصـهار الشمع كامل قبل البدء بالصبغة ومن المعروف أن إنصهار الشمع يساعد على سرعة ذوبانه في الزايلين.

أهمية التجفيف:

1. التخلص من بقايا الماء والكحول من على المقطع النسيجي.
2. إنصهار الشمع داخل وحول المقطع النسيجي وبالتدريج.
3. خلال عملية إنصهار الشمع يحصل تثبيت للمقطع النسيجي علـى الشريحة بشكل جيد لمنع سقوط تلك المقاطع خلال الصبغة.

ملاحظات عامة على عملية القطع:

1. المعرفة التامة بمبدأ عمل الجهاز قبل البدء بعملية القطع ضروري.
2. تفقد الجهاز وقطعة وأجزاءه ومدى صلاحيته للعمل ضروري قبل البدء بعملية القطع تفاديا لحدوث مشاكل ومنعا لإتلاف قطع الجهاز بالإضافة إلى الصيانة الدورية وتشحيم أو تزيت أجزاءه بشكل دوري كل ثلاثة إلى ستة أشهر.
3. ضبط حامل القالب وحامل السكين وزاوية ميل السكين وزاوية الخلوص ضروري لإعطاء مقاطع جيدة وقبل البدء بعملية التقطيع.
4. إختيار سكين جيدة وحادة يعطي مقاطع جيدة ويوفر الوقت.
5. خلال عملية التقليم يجب الإنتباه لحامل القالب وخاصة قاعدته لمنع تراكم الشمع عليها كي لا يحدث أي تغير ولو بسيط جدا بين وضع القالب خلال التقليم ووضعه خلال القطع لأن أي اختلاف يلزمه عمل تقليم جديد للقالب.
6. وخلال التقليم أيضا يفضل ترتيب القوالب على الثلج بحيث توضع العينات القاسية في الآخر حتى تحافظ على السكين ولمنع تثلمها في بداية العمل وقبل القطع.
7. يجب معرفة طبيعية العينة خلال القطع لأن طبيعة العينة لها دورا أساس في جودة القطع ولأن بعض العينات تحتاج إلى قطع بطيء وبعضها يحتاج إلى قطع سريع.
8. عند وضع المادة اللاصقة على الشريحة يجب أن تكون كميتها قليلة على الشريحة نقطة أو نقطتين ومسحها على الشريحة جيدا حتى لا تظهر على الشريحة بعد الصباغة.

9. عند الإنتهاء من عملية القطع يجب الإهتمام بعملية التنظيف وطريقة التخلص من بقايا الشمع والأوساخ بشكل جيد ومحاولة عدم إسقاط إي شيء منها على الأرض حرصا على من يعمل من حوادث التزحلق بسبب الشمع.

10. بالإضافة إلى ما ذكر يجب على من يقوم بعملية القطع الإلمام بالأمور التالية:

أولا: مواصفات المقطع الجيد.

ثانيا: الظروف والعوامل التي تتحكم أو تؤثر على جودة القطع.

ثالثا: مشاكل القطع وطرق حلها.

وسنوردها بالتفصيل لأهميتها

أولا: مواصفات المقطع الجيد:-

يعتبر المقطع النسيجي جيد إذا توفرت فيه الأمور التالية:

1- خلو المقطع النسيجي من التلوث (Contamination) والتلوث هو ظهور أو وجود بقايا من عينات أخرى مع المقطع النسيجي على الشريحة وقد تكون من عينات متشابهة أو مختلفة وقد يحدث التلوث لوجود هذه البقايا على السكين أو على الملاقط المستخدمة أو على الوسط الكحولي (وسط التحميل) أو على الماء في الحمام المائي ولذلك يجب الاهتمام بأن تكون هذه الأشياء نظيفة أو العمل على تنظيفها باستمرار بين العينات.

2- أن يكون المقطع النسيجي كاملا ممثلا للعينة في القالب وأن لا يكون مقطع سطحي من العينة أو جزئي منها وأن يخلوا من التفسخ أو التشقق ويكون ذلك بعمل تقليم جيد للقالب واستعمال سكين

جيدة وحادة للقطع وأن تكون حرارة الحمام المائي مناسبة لأن الحرارة العالية تسبب تفسخ في المقطع النسيجي وكذلك لبعض العينات الطرية والتي يكون تماسك الأنسجة فيها ضعيفا فلا داعي لاستخدام الكحول حيث يتم تحميل المقاطع على الماء مباشرة وبأسلوب جيد ومن الأمثلة على ذلك العينات الدهنية وعينات نخاع العظم وعينات العظام .

3- أن يكون المقطع النسيجي متجانس من حيث السمك وغير مدرج أي أن لا يحتوي المقطع الواحد على مناطق رقيقة جدا ومناطق سميكة لأن ذلك يزيد من صعوبة التشخيص ويحدث ذلك نتيجة إهتزاز السكين أو القالب وهناك حالة أخرى وهي عندما تكون العينات النسيجية قاسية أو السكين خفيفة فأن ذلك يؤدي الى تكون مقاطع مدرجة وفي هذه الحالة يجب تطرية العينات القاسية أو استخدام سكين أكثر وزنا.

4- أن يكون سمك المقطع مناسبا مع طبيعة العينة ويتراوح بين 3-7 ميكرون حيث أن بعض العينات مثل خزعه من الكلية أو عينة من العقد أللمفاوية تحتاج تشخيصها الى مقاطع بسمك 3-4 ميكرون أما أذا كان سمك المقاطع لهذه العينات 5 ميكرون فيكون التشخيص بصعوبة وإذا كان سمكها أكثر من 5 ميكرون فيكون التشخيص صعب جدا أو مستحيل.

5- أن يخلو المقطع النسيجي من الانثناءات والطيات (Folding) حيث أن وجود الثنيات في المقطع يعني اختفاء أجزاء من المقطع النسيجي تحت بعضها بالإضافة لكون هذه الإنثناءات سميكة وصعبة التشخيص عند الإنثناء.

ثانيا- العوامل و الظروف التي تتحكم بجودة المقطع:

هناك عوامل وظروف عديدة تتحكم بجودة المقاطع النسيجية ولا بد من معرفتها للحصول على أفضل النتائج وأفضل الشرائح وإذا كان هناك بعض المقاطع السيئة لا بد من معرفة الأسباب والعمل على حلها وهذه العوامل هي :-

1- **العامل الشخصي**: أن مهارة الفني أو من يقوم بعمل المقاطع وقدرته على استعمال جهاز القطع ومعرفته لطبيعة العينة وقدرته على التعامل مع العينات على اختلاف أنواعها بالإضافة لقدرته على التكيف مع الظروف والمستجدات وقدرته على تحديد المشاكل التي يواجهها والعمل على حلها كل هذه الأشياء تلعب دور أساسي حيث أن العامل الشخصي يظهر قدرة الفني وتفوقه في حالة تساوي باقي ظروف العمل والفني الجيد هو الذي يستطيع أن يعطي أفضل النتائج حتى في أسوء الظروف.

2- **الحالة الصحية و النفسية للفني وظروف العمل والبيئة**: حيث أن الحالة النفسية للفني أو من يقوم بعملية القطع تؤثر بدرجة كبيرة على جودة المقطع وتؤثر في قدرته على العطاء ولذلك لا بد من توفير الراحة النفسية له لإعطاء أفضل ما يمكن وكذلك الأمر بالنسبة للعامل الصحي أو الحالة الصحية للفني أما الظروف المناسبة للعمل فهي لا تقل أهمية عن ما ذكر حيث تؤثر درجة الحرارة في المختبر و الظروف المناخية الأخرى على جودة العمل فمن الصعوبة العمل في مختبر درجة الحرارة فيه منخفضة بدرجة كبيرة أو مرتفعة بدرجة كبيرة أو أن تكون نسبة الرطوبة عالية أو أن يكون هناك مجرى هواء شديد.

3- **جهاز القطع وسكين القطع**: لجهاز القطع من حيث النوع و الجودة ومدى صلاحيته للعمل و مدى صيانته دور أساسي في جودة المقطع أو مدى الإتقان في عملية القطع حيث يوجد أنواع مختلفة من أجهزة القطع ولكل نوع مميزاته

حسناته وسيئاته بالإضافة إلى الاختلاف بين الأجهزة بطريقة العمل أو العينات المناسبة ولذلك يجب اختيار نوع الجهاز الأفضل بالإضافة إلى تفقد الجهاز وعمل صيانة دورية وتنظيف الجهاز وحسن استخدامه لها دور رئيس في إطالة أمد استخدامه والحفاظ عليه وكلما حافظنا على الجهاز بصورة افضل و استخدمناه بالطريقة المثلى كلما طال عمر الجهاز و أعطى أفضل المقاطع بالإضافة الى معرفة ضبط الجهاز واستعماله يجب اختيار نوع السكين المناسب والاهتمام دائما بأن تكون سكين القطع على افضل وجه فأن أي خلل في الجهاز أو أي عيب في السكين ستؤدي الى صعوبة في القطع أو إلى إعطاء مقاطع سيئه.

4- **المراحل السابقة لعملية القطع:** إن لكل مرحلة من المراحل السابقة لعملية القطع دور هام في جودة المقطع او سهولة وصعوبة عملية القطع وسنوردها بالتفصيل للأهمية:

أ. **مرحلة التثبيت:** إن اكتمال عملية التثبيت واختيار نوع المثبت الجيد والمناسب للعينات لها دور أساسي في جودة القطع لأن عدم اكتمال التثبيت أو اختيار مثبت غير مناسب سيؤدي إلى مشاكل في عملية المعالجة وبالتالي مشاكل في القطع كما أن لكل محلول من محاليل التثبيت سرعة معينة في تخلله للأنسجة وبالإضافة لذلك فإن بعض محاليل التثبيت لا يؤثر زيادة الوقت على العينة مهما طال بينما بعض الأنواع يؤثر وبدرجات متفاوتة ولذلك فإن نوع المثبت ووقت التثبيت الكافي أي إكتمال عملية التثبيت واختيار المثبت الجيد كلها تلعب دور مهم في عملية القطع وأفضل محاليل التثبيت هو فورمالين ملطف بتركيز 10% أي (10%Neutral BufferedFormalin).

ب. **المعاينة Gross**: لهذه المرحلة أهمية فإن تحديد المقطع المناسب ومعرفة درجة صلابته أو قساوته وإذا احتوى على مناطق متكلسة أو كان نسيج عظمي أو من نخاع العظم فلا بد من أن تتم عملية نزع الكلس قبل المعالجة وإلا فإن ذلك يؤدي إلى صعوبة جدا في القطع ويجب أن يتراوح سمك المقاطع بين 3-5ملم وأن لا تتجاوز أبعاده الأخرى 2.5سم × 1.5سم ويجب الإنتباه لعدم حدوث تلوث للعينات (Contamination) خلال هذه المرحلة وإلا كان المقطع سيئا كما أنه يجب أن يكون مستوى المقطع بشكل جيد أي أن يكون سطحه مستوي وغير محدب أو منحني وذلك بأن تكون شفرة القطع حادة وعملية القطع مستوية.

ج. **التجفيف Dehydration**: إن اختيار مادة التجفيف المناسبة أو إختيار تراكيز متدرجة بشكل مناسب ومراعاة استبدالها عند زيادة درجة تلوثها مع الإستعمال بالإضافة إلى إعطاء العينة الوقت الكافي لتتم عملية التجفيف لها دورا أساسي في إعطاء المقطع الجيد وعكس ذلك أو زيادة الوقت في محاليل التجفيف بدرجة كبيرة أو إزدياد تلوث تلك المحاليل بصورة كبيرة سيؤدي إلى مشاكل كبيرة في القطع.

د. **الترويق أو التنقية Clearing**: بعد الإنتهاء من التجفيف لابد من التخلص من الكحول بشكل كامل لأنه غير متجانس مع شمع البرافين وبالتالي يجب استخدام مادة الترويق الجيدة ومثال عليها الزايلين بالإضافة إلى نوع وجودة مادة الترويق فإن وقت الترويق له أهمية حيث أن نقصان الوقت للترويق يؤدي إلى بقاء الكحول في العينات مما يمنع تخلل الشمع بشكل جيد وزيادة الوقت بدرجة

كبيرة يؤدي إلى زيادة كبيرة في صلابة العينة مما يسبب صعوبة في القطع بالإضافة إلى مراعاة تغيير مواد الترويق بين الفترة والأخرى حسب درجة الإستعمال.

هـ. **الإشباع Infiltration**: بعد الإنتهاء من الترويق تأتي مرحلة الإشباع ويعتبر شمع البرافين أفضل مادة للإشباع من الناحية العملية ومن هنا فإن إختيار مادة للإشباع الجيدة تسهل عملية القطع وتمكن من الحصول على مقاطع جيدة بالإضافة لنوع المادة فإن درجة نقاوتها أي (درجة انصهارها) له دورا أيضا كما أن الوقت أي عدم إعطاء العينات الوقت الكافي للإشباع فإن العينات ستبقى طرية وينتج عنها أيضا صعوبة في القطع ومقاطع سيئة وتقل درجة نقاوتها مادة الإشباع أي تزداد نسبة الشوائب مع كثرة الإستعمال وخاصة في المرحلة السابقة وهي الترويق وبالتالي لابد من تغيير الشمع أو مادة الإشباع بين الفترة والأخرى حسب درجة الإستعمال وملخص ما ذكر أن إختيار شمع برافين بدرجة انصهار بين $56-58^0$م وإعطاء الوقت المناسب ومراعاة تغييره حسب الإستعمال يعطي أفضل النتائج بالإضافة إلى حرارة سخان الشمع فإن له أهمية كبيرة حيث أن ارتفاع حرارة الشمع عن درجة الإنصهار بأكثر من خمسة درجات مئوية يؤدي إلى طبخ العينات ويسبب قساوتها مما يزيد في صعوبة القطع وعكس ذلك فإن انخفاض درجة حرارة سخان الشمع إلى درجة الإنصهار أو أقل منها بقليل يؤدي إلى بداية تجمد للشمع أي بين السائل والصلب مما يعيق عملية الإشباع وبالتالي تكون صلابة العينات قليلة وبالتالي ستؤدي إلى مشاكل في القطع وتعطي مقاطع سيئة.

و. **الطمر (الإدماج) Embedding**: بعد الإنتهاء من الإشباع تأتي مرحلة الطمر وغالبا أو دائما تستخدم مادة الإشباع نفسها في عملية الطمر أي غالبا ما يستخدم شمع البرافين في عملية الطمر ولذلك يسمى المقطع النسيجي (Paraffin Section) وعملية الطمر لها دور رئيسي في سهولة القطع والحصول على مقاطع جيدة وإن الأخطاء التي تحصل في عملية الطمر غالبا ما تنعكس بشكل مباشر في عملية القطع وتتمثل هذه المشاكل في: أ. **طريقة عمل القالب حيث أن تكون فقاعات في القالب خلال صب الشمع سيؤدي إلى تكسر في القالب أو العينة خلال القطع وتكون طبقات غير متجانسة من الشمع في القالب قد تؤدي أيضا إلى تكسره وتفتت العينة. ب. وجود شوائب في الشمع تؤدي إلى تمزق المقاطع خلال القطع وخاصة إذا كانت الشوائب صلبة أو قاسية. ج. وضع العينة في القالب وقد ذكرت الطريقة الصحيحة لوضع العينات في القالب خلال مرحلة الطمر بالتفصيل وإن أي خطأ من وضع العينة سيؤدي إلى صعوبة في القطع أو سينتج عند مقاطع سيئة.**

6- **طبيعة العينة**: إن لطبيعة العينة دور رئيسي في سهولة أو صعوبة القطع بالإضافة للحصول على مقاطع جيدة أو سيئة وتقسم العينات من حيث طبيعتها إلى ستة أقسام:

أ. العينات الطرية لاحتوائها على كميات كبيرة من الأنسجة الدهنية أو العينات الدهنية وتتميز هذه العينات ببقائها طرية حتى بعد الإشباع بالبرافين ويكون القطع صعبا والحل هذه المشكلة يمكن تبريد القالب بدرجة أكبر مما يعطي صلابة أكثر للنسيج وبالتالي تحسن من القطع أو ترك القالب ليوم آخر فتشبع العينة بالشمع بدرجة أكبر مما يعطي صلابة أكثر للنسيج وبالتالي تزيد من صلابة

العينة أو عمل مقاطع أكثر سمكا حوالي 6 أو7 ميكـــرون إلا إذا كانت العينات تحتاج إلى سمك أقل.

ب. العينات الطرية لإحتواء النسيج على مواد طرية غير متجانسة مـع النسيج الذي حولها مثل الحويصلات ولأكيـاس في المبيـض أو الأكياس الدهنية Sebaceous Cysts أو غيرها وبالتبريد الزائـد أيضا يمكن زيادة صلابة هذه المواد لدرجة نستطيع معها الحصـول على مقاطع جيدة أو نكتفي بظهور الإطار المحيط بالمادة أي جدار الحوصلة أو الكييس.

ج. عينات الغدة الدرقية حيث أنها تحتوي على حويصـلات مليئـة بسوائل عالية اللزوجة ولعدم تجانس مكونات تلـك العينـات النسيجية فمن الصعب قطع هذه العينات والحصول على مقـاطع جيدة دون اللجوء لتبريدها بدرجة كبيرة.

د. العينات المحتوية علـى كميـات كبـيرة مـن الـدم المتخـثر Blood Clot وتتميز هذه العينات بعدم تماسكها ومن الصعوبـة أيضا الحصول على مقاطع جيدة دون التبريد الزائد للقوالب.

هـ. العينات القاسية (غير المتكلسة) مثل العينات التي تحتـوي علـى كميات كبيرة من الكيراتين وهذه العينات بدون تبريدها الزائد لا يمكن الحصول على مقاطع جيدة حيث أن عملية التبريد تزيد مـن صلابة الشمع بدرجة قريبة من صلابة العينة وبالتالي تسهل عملية القطع وتمكن من الحصول على مقاطع جيدة نوعا مـا ويمكـن تطرية العينة بوضع القالب بعد التقليم على محلول التطرية لمـدة

15-30 دقيقة وثم وضعه على الثلج المبروش ومحلـــول التطريـــة يتكون من محلول 10% HCL.

و. العينات القاسية لوجود تكلس فيها وهذه العينات يجـــب نـــزع الكلس منها قبل أن تمر بمراحل المعالجة وإذا وجد أي بقايا تكلس في القالب فإنها سوف تحدث تثلمات لسكين القطع وســـتعطى مقاطع مشققة وحل هذه المشكلة يكون بتطرية سطح القـــالب بمحلول التطرية الخاص والمكـــون مـــن 10% HCL حـــامض الهيدروكلوريك ثم تبريد القالب وبعدها عمل المقاطع ويفيد هـــذا المحلول أيضا بتطرية العينات القاسية لأسباب أخرى مثل: وجـــود طبقة كيراتينية سميكة أو مواد أخرى.

ثالثا: مشاكل القطع وطرق حلها:

المشكلة	السبب	العلاج
1. عدم تكوين شريط متسلسل من المقاطع النسيجية.	أ. الشمع صلب بالنسبة للنسيج والظروف المحيطة. ب. عدم توازي حافتي القطع. ج. وجود شوائب على حافة السكين. د. سرعة القطع بطيئة. هـ. القطع على سمك كبير. و. زاوية الخلوص قليلة (ميل السكين كبير).	* النفخ على القالب أو الطمر في شمع أقل صلابة. *إعادة التقليم. *تنظيف الحد القاطع بالزايلين. * زيادة سرعة القطع. *تقليل سمك القطع. *زيادة زاوية الخلوص (تقليل ميل السكين).
2. التفاف المقاطع إلى أعلى السكين.	أ. الشمع صلب وغير مناسب السمك والحرارة. ب. حافة السكين غير حادة. ج. انحناء السكين زائد (زاوية الخلوص قليلة). د. وجود شوائب على السكين. هـ. وجود كهرباء ساكنة مشحونة. و. سمك القطع كبير.	* تقليل سمك القطع أو رفع حرارة السكين أو القالب أو غمر القالب في شمع طري. *تغيير السكين أو شحذها. * تقليل إنحناء السكين (زيادة زاوية الخلوص. * تنظيف السكين بالزايلين. * استعمال بخاخ للتخلص منها. * تقليل سمك القطع.

المشكلة	السبب	العلاج
3. انضغاط المقاطع	أ. السكين غير حـــادة أو حافتها غير نظيفة.	* إعادة شحذ الســـكين أو تغيير مكان القطع أو تنظيـف حافة القطع.
	ب. الشمع طري وغـــير مناسب السمك.	* إستعمال شمع أكثر صلابـة أو زيادة سمك القطع.
	ج. القـــالب غـــير مـــبرد بشكل جيد.	* تبريد القالب بشكل جيد.
	د. إنحناء الســـكين قليـــل (زاوية الخلوص كبيرة).	* زيادة إنحناء السكين (تقليل زاوية الخلوص).
	هـــ. معالجة النسيج غـــير مكتملة.	* إعادة المعالجة بشكل جيد.
	و. حافة الســـكين غـــير نظيفة.	* تنظيف حافة السكين.
	ز. حـــامل القـــــالب أو السكين غير ثابتة.	* تثبيتها جيدا.
	ح. القطع سريع.	* القطع ببطيء واكثر.
4. عدم تماثل سمك المقاطع	أ. عدم ثبات القـــالب أو السكين.	* تثبيتهم جيدا.
	ب. جهاز التغذيـــة غـــير مضبوط.	* صيانة الجهاز وتشحيمه.
	ج. إنحناء السكين زائـــد (زاوية الخلوص قليلة).	* تقليل إنحناء السكين.
	د. السكين مثلمة.	* شحذ السكين أو تغييرها.
	هـــ. صلابة زائدة للعينة.	* إعادة المعالجة بشكل جيد.

المشكلة	السبب	العلاج
	و. حافة السكين غير نظيفة.	* تنظيف حافة السكين.
	ز. حامل القالب أو السكين غير ثابتة.	* تثبيتها جيدا.
	ح. القطع سريع.	* القطع ببطيء وأكثر.
5. إنشقاق المقاطع طوليا.	أ. وجود ثلمات في حد السكين.	* تغيير مكان القطع أو شحذ السكين.
	ب. إحتواء الشمع على شوائب صلبة.	* إعادة الطمر بشمع نقي.
	ج. وجود تكلسات في النسيج.	* إزالة التكلس من النسيج.
	د. وجود شوائب أو بلورات على حد السكين.	* تنظيف حافة السكين.
	هـ. تكون بلورات أو وجود فقاعات هوائية في القالب.	* إعادة الطمر مع التبريد لمنع تكون تلك الفقاعات.

المشكلة	السبب	العلاج
6. تكوين شريط متسلسل ملتو.	أ. عدم تساوي حدة السكين. ب. عدم توازي حافتي القالب العليا والسفلي. ج. حواف القالب غير متوازية مع السكين. د. سخونة أحد جانبي القالب أكثر من الجهة الأخرى. هـ. وجود شوائب على السكين.	* شحذ السكين جيدا. * إعادة التقليم. * تعديل موقع السكين ليصبح موازي للقالب. * تبريد القالب في الثلج. * تنظيف حافة القطع.
7. عرض المقطع أقل من عرض القالب.	أ. الحد القاطع للسكين عريض. ب. إنحناء السكين زائد (زاوية الخلوص قليلة).	* شحذ السكين بطريقة صحيحة. * تقليل إنحناء السكين زيادة زاوية الخلوص.
8. التصاق المقاطع بالسكين.	أ. ميل السكين قليل. ب. حد السكين مثلم. ج. وجود بقايا صلبة أو شوائب على حافة المقطع.	* زيادة ميل السكين. * شحذ السكين. * تنظيف حافة القطع بالزايلين وبشكل جيد.
9. تفتت المقاطع النسيجية وتفسخها خلال القطع.	أ. عملية التجفيف أو التنقية غير مكتملة. ب. زيادة مدة التشريب في الشمع بدرجة كبيرة (طبخ العينات).	* إعادة العمليات أو تغيير المحاليل. * لا علاج له.

المشكلة	السبب	العلاج
	ج. حرارة الشمع خلال التشريب كانت عالية.	* لا علاج له.
	د. الشمع طري لا يناسب العينة.	* تبريد القالب بالثلج أو إعادة الطمر بشمع أكثر صلابة.
	هـ. قساوة كبيرة في النسيج بسبب عدم نزع الكلس.	* إعادة المعالجة بشكل عكسي ثم نزع الكلس وبعدها المعالجة مرة أخرى أو وضع القالب في محلول نزع الكلس.
	و. طراوة العينة بدرجة كبيرة لوجود كمية كبيرة من الدهون أو مواد أخرى مثل الدم المتخثر.	* زيادة سمك المقاطع أو تأجيل قطع القالب ليوم آخر أو زيادة التبريد.
10. حدوث صوت خلال التقطيع.	أ. قساوة زائدة للنسيج.	* إذا كانت القساوة بسبب التكلس راجع رقم 9 فرع هـ.
	ب. تعرض النسيج للكحول لمدة طويلة أكثر من اللازم.	* إذا كانت القساوة بسبب آخر وضع العينة في محلول التطرية لمدة من الزمن.
	ج. وجود بلورات صلبة في القالب.	* إعادة الطمر بشمع نقي.
11. المقاطع مدرجة أو متموجه أي تحتوي على مناطق سمكية وأخرى رقيقة.	أ. حامل القالب أو حامل السكين أو السكين غير مضبوطة بشكل جيد.	* ضبطها بشكل جيد.
	ب. ميل السكينة كبير (زاوية الخلوص قليلة).	* ضبط زاوية الخلوص (تقليل ميل السكين).
	ج. العينة قاسية بسبب التكلس.	* نزع الكلس.
	د. العينة قاسية بسبب التكلس.	* وضع القالب في محلول التطرية.
	هـ. السكين خفيفة.	* استخدام السكين أثقل.
	و. صلابة النسيج لا يلائمها استخدام شمع البرافين.	* استعمال مادة الطمر أصلب من الشمع.

ملاحظة:

أ. محلول نزع الكلس الفوري من القالب Hcl 10% يوضع القالب لفترة عدة دقائق إلى نصف ساعة ويعتمد على درجة القساوة.

ب. محلول التطرية تتكون من 10% جلسرين كمية 10مل مضافة إلى 90مل كحول إيثيلي تركيز 60% ويوضع ساعة أو أكثر في المحلول.

الفصل السادس

الصباغة Staining

مقدمة تاريخية:

كان أول إستعمال للصبغة في الأنسجة عام 1719م باستعمال صبغة السفرون و لم تنجح العملية حيث كان يتم فحص الأنسجة غير مصبوغة وفي عام 1849م استعملت صبغة الكارمين لصباغة الأنسحة وتعتمد الصبغة غالبا على تفاعلات كيماوية في الأنسجة تعطي آلوان لتلك المكونات النسيجية.

الهدف من الصبغة:

لأن مكونات الأنسجة والخلايا شفافة وغير ملونة فلابد من صباغتها لمعرفة تلك المكونات ودراستها والتمييز بينها وبالتالي فإن الهدف من الصبغة هو إعطاء توضيح للمكونات النسيجية والخلوية بحيث يمكن تمييز أنواع الخلايا ومكوناتها والمكونات النسيجية الأخرى باستخدام المجهر وذلك التمييز يتم **بعدة طرق منها:**

1. إدخال اختلاف في النفاذية للضوء (Contrast) بحيث يؤدي إلى وجود اختلاف في معامل انكسار الضوء بين المكونات النسيجية وخاصة باستخدام العدسات المستقطبة Polorized Microscope أو نوع آخر يعرف بـ Phasecontrast Microscope.
2. إدخال آلوان مختلفة على المكونات النسيجية والخلوية بحيث يسهل التمييز بينها باستخدام المجهر الضوئي حيث أن الجزء الملون باللون

الأحمر يمتص جميع أطياف الألوان باستثناء طيف اللون الأحمر وبالتـلي يظهر باللون الأحمر وهكذا بجميع الألوان الأخرى وغالبا ما تكـــون العينات خاصة بمكونات نسيجية معينة حيث أنها تصبغ تلك المكونات وتترك المكونات الأخرى بدون صباغة أو يمكن إزالة الصبغـــة عـــن المكونات الأخرى إذا أخذت اللون باستعمال محاليل التمييز وتتمـــيز الصيغة الجيدة بأنها تكون على درجة عالية من التخصص والحاسية أي أنها تصبغ مكونات نسيجية وخلوية معينة ومحددة ولو كانت بتراكـيز قليلة.

الطرق العامة لتمييز المكونات النسيجية والخلوية

طرق الصبغة	نوع المكونات المميزة	طرق التحضير	نوع الصبغة
1. الصبغات الحيويـــة .Vital Stain	أ.**Reticuloendothelial** ب. الميتوكوندريا.	خلايا وأنسجة حية.	Trypan Blue Janes Green
2. الذائبية الإختيارية	أ. القطرات الدهنية	مقطع مجمد F.S.	Sudan Black
3. إنتـــاج مـــــواد كيماوية ملونة.	أ. مكونـــات ثابتـــة هيموســــــــدرين (Hemosidren)	* جميع أنـواع المقاطع	**Perls Stain**

طرق الصبغة	نوع المكونات المميزة	طرق التحضير	نوع الصبغة
	ب. غير ثابتة (الأنزيمات).	* مقاطع محضرة بطوق خاصة.	Histochemistry
4. ترسيب المواد المعدنية (Impregnation).	أ. داخل الخلايا (الميلانين). ب. خارج الخلايا (الآلياف الشبكية).	* جميع المقاطع * جميع المقاطع	Masson Fontana Reticulin Stain
5. الصباغة باستعمال الصبغات الملونة.	أ. الطريقة العامة للأنسجة. ب. التبدل اللوني الغضاريف (Metachromasia) و(Amyloid). ج. تحديد مكونات معينة مثل DNA.	* جميع المقاطع * جميع المقاطع * مقاطع شمع البرافين.	Hye H&E (Hematoxylin and Eosin) Thionin And Crystalviolet Feulgen Reaction

الطريقة الأولى: الصبغات الحيوية:

يتم صباغة الأنسجة والخلايا الحية أما بوضع تلك الخلايا والأنسجة في محلول الصبغة الحيوية أو حقن محلول الصبغة داخل الحيوان أو داخل الأنسجة دون إحداث تلف تركيبي أو وظيفي على تلك الخلايا أو الأنسجة ويتم صباغة بعض

مكونات السيتوبلازم عن طريق إبتلاع تلك المكونات والعضيات لجزيئات الصبغة أما النواة فلا تصبغ بالصبغات الحيوية لأن جدار النواة للخلية الحية غير نفاذ للصبغة الحيوية وتقسم الصبغات الحيوية إلى:أ.صبغات حامضية مثل صبغة Congo Red.
ب. صبغات قاعدية مثل صبغة Methylene Blue , Toluidine Blue.

وتفيد الصبغات الحيوية في:

1. إعطاء فكرة جيدة عن التركيب الخلوي.
2. إعطاء معلومات عن وظائف الخلية كالنفاذية والإبتلاع وإخراج المواد والإنتقال والإمتصاص.
3. للمقارنة بين الخلايا في الإنسجة المصبوغة بالطرق الأخرى وتستعمل تلك الصبغات بشكل عام بتراكيز قليلة جدا حتى لا يكون لها آثر سام على الخلايا.

الطريقة الثانية: الذائبية الإختيارية:

تستعمل صبغات معينة لا تذوب في الماء وتذوب في الكحول الإيثيلي بدل من الماء مثل صبغة Sudan Black والهدف منها الكشف عن الدهون في المقاطع النسيجية.

الطريقة الثالثة: الصباغة عن طريق إنتاج مواد كيماوية ملونة:

وتكون باستخدام صبغات أو مواد شاحبة اللون أو غير ملونة حيث تتفاعل مع مكونات نسيجية معينة وتعطى نواتج ملونة والناتج أما أن يكون صبغة حقيقة أو مادة ملونة ومن الأمثلة على النوع الأول أي صبغة حقيقية صبغة PAS حيث يستعمل كاشف (Schiff Reagent) فيها وصبغة فولجين (Feulgen) ومن الأمثلة على النوع الثاني صبغة الحديد (Perl's Stain) بالإضافة إلى طرق مختلفة لدراسة الأنزيمات ومميزات الأورام وما يعرف بـ (Tumor Markers)

حيث تحول الأنزيمات في هذه الحالات مواد كيماوية (كواشف) غير ملونة أو ذات آلوان شاحبة إلى مواد ملونة مميزة وخاصة أو قد تنتج مواد أخرى غير ملونة يمكن إستبدالها بمواد أخرى ملونة وفي جميع الحالات تعتمد هذه الطريقة على إنتاج مادة نهائية ملونة.

الطريقة الرابعة: الصباغة عن طريق ترسيب ذرات لبعض المواد المعدنية:

وتعتمد هذه الطريقة على تحويل بعض المواد المعدنية في المركبات الكيماوية بواسطة مكونات نسيجية وبطرق معينة من الحالة الأيونية إلى الحالة الذرية حيث تترسب بلون معتم وغالبا ما يكون لون أسود ومثال على ذلك ترسيب الفضة على الألياف الشبكية بصبغة (Reticulin,Stain) ومن الأمثلة الأخرى أيضا صبغة الميلانين (Masson Fontana) والميلانين من مشتقات التيروسين (حامض أميني) ويكون الإختزال في هذه الحالة مباشر وتسمى الخلايا التي يترسب فيها الفضة بهذا الشكل Argentaffin Cells أما في حالة ترسيب الفضة بشكل غير مباشر أي باستخدام مواد مختزلة فتسمى هذه الخلايا Argyrophil Cells.

الطريقة الخامسة: وهي الطريقة العامة وتكون باستخدام صبغات طبيعية وصبغات صناعية:

تقسم الصبغات من حيث المنشأ إلى صبغات طبيعية وصبغات صناعية:

أولا: الصبغات الطبيعية:

وهي صبغات محضرة من مصدر حيواني أو نباتي حيث يتم استخلاصها بطرق مختلفة وأهم هذه الصبغات:

1. **هيماتوكسلين:** ويستخلص من لحاء شجرة بقولية تزرع في أمريكا الجنوبية والوسطى وتسمى Haematoxylin Campechianum وتتم عملية الاستخلاص بمعاملة الجذوع بالإيثر ثم يجفف وتذاب في الماء ثم تصفى وتبلور وتكون الصبغة عندها ضعيفة من حيث الميل والإرتباط مع مكونات النسيجية حيث لا بد من أكسدة هيماتوكسلين إلى مادة الهيماتين وتتم هذه الأكسدة بشكل طبيعي أو كيماوي ومن الجدير بالذكر أن مادة الهيماتين تلك الناتجة عن أكسدة الهيماتوكسلين ليس لها علاقة بمادة الهيماتين الموجودة في خلايا الدم الحمراء ونظرا لصعوبة استخلاص الهيماتوكسلين فإنه يكون غالي الثمن.
2. **صبغة القرمز:** وتستخلص من جسم إناث حشرة صغيرة تعيش على نبات العبار وتسمى (Coccun Cafi) حيث تجمع الحشرات وتجفف ويكون القرمز على شكل مسحوق ليس له ميل للصبغة إلا إذا أضيف له مرسخ مثل شب الحديد أو الألمنيوم وهو صبغة للأنوية وإذا غلي القرمز مع المرسخ ينتج راسب غير ذائب يسمى الكارمين وإذا أضيف له حامض الخليك الثلجي يعطي صبغة تسمى Acetocarmin) وهي جيدة لصباغة الأنوية اما إذا أضيف له حامض البكريك فإنه يعطي(Picrocarmine) حيث يستخدم لصباغة الأنسجة العصبية.
3. **الأورسين:** صبغة نباتي تستخرج من الأشنات (Lichens) بواسطة معالجتها بالأمونيا والهواء ويكون لونها بنفسجي وتستخدم بشكل أساسي لصباغة الألياف المرنة.
4. **السافرون:** وتستخرج من مياسم أزهار نبات الزعفران وتستخدم مع صبغات أخرى لصباغة الأنسجة الضامة.

ثانيا: الصبغات الصناعية:

صبغات تتكون من مواد عضوية مصنعة ومشتقة من الفحم ولكن استبدل الفحم حديثا بمشتقات البترول ويشمل تركيب الصبغة ثلاثة مكونات أساسية وهي وهي:

1. المكونات الهيدروكربونية: مثل البترين والتولوين والنفثالين والفينول حيث أن كل مجموعة من هذه المجموعات تحتوي على حلقة البترين (عديم اللون).
2. حامل اللون (Chromophores): حيث ترتبط إلى حلقة البترين بمجموعة أو أكثر ويسمى حامل اللون مع حلقة البترين بمولد اللون (Chromogen) ويقسم حامل اللون إلى ثلاثة مجموعات هي:

أ. مجموعة النيترو ($-NO_2$).

ب. مجموعة حلقة الكونيون Quinonoid Ring.

ج. مجموعة الآزو Azo Coupling.

وتشمل:

جـ1 أندامين =N-

جـ2 آزو -N =N-

جـ3 آزين $-\left\{\begin{matrix} N \\ N \end{matrix}\right\}-$

ولكن باستعمال هذه المركبات تكون الصبغة ضعيفة وبطيئة ومن السهولة إزالتها حتى بأبسط الطرق وبالتالي لا بد من إضافة مجموعة أيونية.

3. المجموعات المتأنية (مساعد اللون) (Auxo Chromes) حيث أن إضافة مساعد اللون لمولد اللون يكون الصبغة الحقيقية أي أن مساعد اللون يزيد من شدة الصبغة سالبة (حامضية) أو موجبة (قاعدية) ومن المجموعات المتأنية الحامضية مجموعة الكبريتات $-SO_3H$ ومجموعة الكاربوكسيل $-COOH$

ومجموعة الهيدروكسيل OH^-–، أما من المجموعات القاعدية مجموعة الأمـــين NH_2^+– وقوة الصبغة تعتمد على عدد المجموعات المتآنية فيها وبشكل مختصر يمكن القول أن الصبغة الصناعية مكونة من حلقة بنـــزين ترتبط مع حامل اللون من جهة ومع مساعد اللون من جهة أخرى بالإضافة إلى ذلك بعض الصبغـات تحتوي على مجموعات من الميثيل أو مجموعات الإيثيل وهذه المجموعات الأخيرة عند وجودها في الصبغة تعطي الصبغة قوة كبيرة ولون شديد وغامق مثل صبغة (Crystal Violet) ونستنتج مما سبق أن تأين الصبغة يكـــون قـاعدي إذا احتوت على مجموعة الأمين ويكون التاين حامضي إذا احتوت على مجموعـــة الكاربوكسيل أو المجموعات السالبة الأخرى أي أن حامضية أو قاعدية الصبغـة تعتمد على مساعد اللون أما حامل اللون فدوره في ذلك ضعيـــف وأن لـــون الصبغة يعتمد على حامل اللون أما قوة الصبغة فتعتمد علـــى عـــدد أيونـــات الهيدروجين المستبدلة في حلقة البنـــزين بمجموعات مساعدات اللون بالإضافـة إليها المجموعات المضافة من الميثيل أو الأيثيل أي أن بقاء أيونات الهيدروجـــين بدرجة كبيرة في حلقة البترين عندها يمثل الصبغة أي اللون الأصفر مثل حـامض البكريك وعند استبدال أيونات الهيدروجين يصبح اللون أحمرا وبنفســـجي أو أخضر أو أزرق حسب عدد المجموعات المستبدلة ونوعها والصبغة التي تحتـــوي على مجموعات الإيثيل يكون لونها أغمق من الصبغات التي تحتوي مجموعـــات الميثيل.

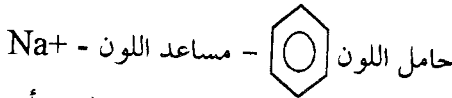
ومن الأمثلة على الصبغات الصناعية صبغة:

- الفوكسين الحامضي Acid Fuchsin.
- الفوكسين القاعدي Basic Fuchsin.
- Crystal Violet.
- Anitine Blue •

- الأيوسين Eosin.
- ثيونين Thionin.
- Methylene Blue.
- Neutral Red.
- Picric Acid.
- TryPan Blue.

الصبغات الحامضية والصبغات القاعدية والصبغات المتعادلة:

تعتبر الصبغات كمكونات جافة عبارة عن مسحوق على شكل أمـــلاح ثابتة، **الصبغة الحامضية:** هي أملاح حامض ملون (شحنة سالبة) وتكون علـى شكل أملاح الصوديوم (موجب الشحنة) أي أن مساعد اللون يحمل شحنة سـالبة وآيون الصوديوم يحمل شحنة موجبة فتكون الصبغة متعادلة الشحنة (ملح) وتكون الصبغة كالتالي:



أما **الصبغة القاعدية (الأيونية الموجبة)** هي أملاح فيها قاعدة ملونـة أي مساعد اللون يحمل شحنة موجبة ترتبط بأيونات الكلور (أملاح الكلور) وتكـون الصيغة للصبغة كالتالي : C 1 -مساعد اللون- حامل اللون

وعندما تذاب الصبغة في المذيب (الماء أو الكحول) أو أي مذيـــب آخـــر تتـــأين (تتحلل) لتعطي صبغات حامضية أو قاعدية والأفضل أن تسمى صبغات ســـالبة الشحنة وصبغات موجبة الشحنة.

ومن هنا نستنتج أن **الصبغة الحامضية:** هي الصبغة التي تعطي عند تآينـــها (إذابتها) أيون الهيدروجين أو أي أيون موجب آخر مثل الصوديــــوم للمحلــول فتصبح الصبغة سالبة الشحنة أما الصبغة القاعدية فهي الصبغة التي تعطـــي عنـــد

إذابتها (تأينها) للمحلول أيونات مجموعة الهيدروكسيل (OH^-) أو أي أيونات سالبة أخرى مثل الكلور (CL^-) حيث تصبح الصبغة موجبة الشحنة، ومن الجدير بالذكر أن حامضية الصبغة أو قاعديتها ليس له علاقة بدرجة الحموضة ولذلك ذكرنا أنه يفضل تسميتها بالصبغة موجبة الشحنة أو الصبغة سالبة الشحنة ومن الناحية العملية وجد أن الصبغة القاعدية (موجبة الشحنة) تكون في المحلول حامضية قليلا (درجة الحموضة أقل من 7) لوجود أيونات الكلور السالبة بينما الصبغات الحامضية (سالبة الشحنة) تكون قاعدية قليلا (درجة الحموضة أكثر من 7) لوجود أيونات الصوديوم الموجبة وملخص ما ذكر أن الصبغة القاعدية مثل Basic Fuchsin مكونة من قاعدة ملونة (أيون موجبة) وآيون سالب غير ملون (أيون الكلور) بينما الصبغة الحامضية مثل Acid Fuchsin مكونة من حامض ملون وآيون قاعدي غير ملون (أيون الصوديوم).

الصبغة المتعادلة: تتكون من اتحاد صبغة قاعدية مع صبغة حامضية أي أنها مكونة من صبغة حامضية وصبغة قاعدية وغالبا تشكل هذه الصبغات محاليل مستحلبة (غرويه) وذائبيتها في الكحول عالية بينما ذائبيتها في الماء ضعيفة بينها ذائبية الصبغات الحامضية والقاعدية جيدة في كل من الماء والكحول ومن الأمثلة على الصبغات المتعادلة صبغة Neutral Red وصبغة Romanowsky والتي تتكون من إتحاد صبغة أزرق المثلين مع صبغة الأيوسين حيث تستعمل بشكل عام لصباغة شرائح الدم وصبغة لشمان أيضا تعتبر من الصبغات المتعادلة.

الصبغات المترددة: وهي صبغات تكون حامضية على درجة حموضية معينة وقاعدية على درجة حموضية أخرى ومن الأمثلة عليها صبغة الكارمين.

* ومن الناحية العملية فإن الصبغات القاعدية تصبغ الشق الحـــامضي في الأنسجة بينما تصبغ الصبغات الحامضية الشق القاعدي في الأنسجة أما الصبغــات المتعادلة فتصبح الشق الحامضي بلون وتصبغ الشق القاعدي بلون آخر.

الصبغــات المعروفــة بإســم Fluorescent Staining الصبغات البراقة:

تعتمد هذه الصبغة على مبدأ أن تلك الصبغات عندما ترتبط مع المكونـات النسيجية يصبح لديها القدرة على تحويل مسار الأشعة فوق البنفسجية (غير مرئية) (Ultraviolet) إلى مســـار الأشـــعة المرئيـــة ويســـتعمل المجـــهر (Fluorescent Microscope) لهذه الغرض في جو معتم بالإضافة لذلك فـــإن هذه الصبغات تتفاعل مع مكونات نسيجية لا تصبغ بأي من الصبغات الســـابقة (الحامضية أو القاعدية) وبالتالي تفيد في دراستها وتشخيصها.

مبدأ عمل الصبغة:

تعتمد عملية الصبغة على مبادئ فيزيائية وأخـــرى كيميائيـــة وبشـــكل متداخل حيث لا يمكن الفصل بينها في التأثير ويمكن القول أنها تعتمد على مبـــدأ فيزيو كيميائي.

المبدأ الفيزيائي:

يمكن دخول الصبغة للأنسجة بطرق مختلفة ومتكاملة منها:

أ. **الأدمصاص Adsorption**: وهي خاصية للأجسام الصلبة إذا كانت جزيئاتها ومكوناتها صغيرة جدا وتكون نتيجة الإنجذاب إلى السطح الحر وهذه الطريقة للصبغة يمكن إزالتها بسهولة بالمـــاء أو الكحول وتعتمد هذه الطريقة على كثافة المكونـــات النســـيجية

ومدى نفاذيتها للصبغة وهذا يعني أن المكونات الأكثر كثافة (التي تحتوي على مواد بروتينة أكثر في وحدة الحجم) تأخذ الصبغة بدرجة أكبر من المكونات الأقل كثافة وعند تمايز الصبغة تتحرر الصبغة بسرعة عن المكونات الأقل كثافة وتبقى على المكونات الأكثر كثافة.

ب. **النفاذية الإختيارية Selective Permeability**: حيث أن المكونات النسيجية الأكثر نفاذية للصبغة تأخذ الصبغة بشكل أسرع وتتحرر عنها الصبغة عند التمايز بشكل أسرع أيضا أما الأنسجة الأقل نفاذية فتحتاج إلى وقت أطول للصبغة ووقت أطول في التمايز أي من الصعب إزالتها.

ج. **الذائبية**: حيث أن بعض الصبغات تذوب في مكونات نسيجية معينة ولا تذوب في مكونات أخرى وبالتالي فإنها تصبغ بعض المكونات النسيجية ولا تصبغ أخرى مثل صبغة الدهون ومنها Sudan Black.

د. **الخاصية الشعرية والخاصية الأسموزية**: حيث أن لهذه الخواص دور في تخلل الصبغة للمكونات النسيجية.

هـ. **قوة التجاذب بين المكونات النسيجية والصبغات نتيجة لإختلاف الشحنة بينها**: حيث الصبغات التي تحمل شحنة موجبة تنجذب للمكونات النسيجية التي تحمل شحنة سالبة والعكس بالعكس وسيتم التركيز على تلك الخاصية من الناحية الكيميائية في مبدأ عمل الصبغة.

المبدأ الكيميائي:

التفاعلات الكيميائية بين الصبغة والمكونات النسيجية: يجب أن تتـأين الصبغة في المحلول لتعطي أيونات سالبة ملونة أو أيونات موجبة ملونة والتي تتفاعل مع المكونات النسيجية لتعطي مركبات ملونة أو تعطى لون النسيج وعلى أساس أن الصبغة القاعدية هي الصبغة التي تعطى أيونات ملونة موجبة علـى آيـة درجـة حموضية تم عليها التفاعل أما الصبغة الحامضية فهي الصبغة التي تعطي أيونات ملونة سالبة وكذلك مهما كانت درجة الحموضية أما الصبغة المـترددة Amphoteric فهي الصبغة التي لا تتأين على درجة حموضة معينة بينما يكون تأينها قاعدي علـى درجة حموضة أقل منها بينما يكون تآينها حامضي على درجة حموضة أعلى منـها ولتوضيح ذلك نأخذ المثال التالي:

PH / الصبغة	3	4	5	6	7	8	9	10	التأين
Crystal Violet	+	+	+	+	+	+	+	+	صبغة قاعدية
Orarg G	–	–	–	–	–	–	–	–	صبغة حامضية
Hematin	+	+	+	+		–	–	–	صبغة مترددة

وبما أن البروتينات والمكونات النسيجية الأخرى تحمل شحنات موجبـة أو سالبة أو تحمل كلا الشحنتين الموجبة السالبة على درجة الحموضة العادية ومـن الأمثلة على ذلك.

من المكونات الحامضية: (تحمل شـحنة سـالبة): 1. الـ DNA، RNA، الدهون المفسفرة وحامضيتها تعود إلى وجود مجموعة الفوسفات سلبية الشحنة أما الخلايا Mast Cells والأنسجة الغضروفية فتعود حامضيتها هـي والإفـرازات الحامضية لوجود مجموعات سالبة (كبيرتات أو مجموعة الكاربوكسيل).

من المكونات النسيجية القاعدية: الكولاجين وخلايا الدم الحمراء وحبيبات الخلايا الحامضية Eosinophil حيث تعود قاعديتها لسيادة المجموعة القاعدية في الأحماض الأمينية (مجموعة الآمين NH_3^+–).

من المكونات المترددة: البروتينات في السيتوبلازم وبروتينات العضلات حيث تتوازن فيها المجموعات الموجبة (الأمين) مع المجموعات السالبة (الهيدروكسيل أو الكابوكسيل) وبالتالي فإن تآين تلك البروتينات يعتمد على درجة حموضة الوسط.

تآين المكونات النسيجية

حامضي	قاعدي	متردد أو متعادل
DNA, Chrom	Collagen	Cytoplasm
RNA	Redblood Cells	Muscle
Mytine, Cartilage Mucous Secretion	Granules Of Eosinophil	

وتفسير المكونات المتعادلة أو المترددة: يكمن في أن تآين تلك المكونات يعتمد على درجة حموضة الوسط لذلك تتصرف تلك المكونات كمواد حامضية على درجة حموضة معينة وكمواد قاعدية على درجة حموضة أخرى أي إذا كانت درجة حموضة محلول الصبغة حامضية (درجة الحموضة أقل من 7) فإن تلك المكونات تتأين تأين قاعدي أما إذا كانت درجة حموضية محلول الصبغة قاعدي (درجة حموضتها أكبر من 7) فإن تآين تلك المكونات النسيجية يكون حامضي ومن المعروف أن لكل من المكونات النسيجية درجة حموضة معينة يكون عليها الجزيء فيه عدد متساوي من الشحنات الموجبة والسالبة وتسمى تلك الدرجة (I.E.P isoelectropoint) حيث تكون درجة حموضية المحلول أو الوسط أقل من تلك الدرجة (IEP) إلى الجهة الحامضية فإن الطرف الحر الكاربوكسيلي (-Coo) لتلك المكونات يأخذ أيون الهيدروجين من الوسط وبالتالي تصبح محصلة

الشحنة للجزيء موجبة وتتفاعل تلك المكونات كقاعدة وذلك لزيادة أيونات الشحنة الموجبة (مجموعة الأمين) NH_3^+–، وهذا يعني أن تلك المكونات تتفاعل مع الصبغة الحامضية لأنها تحمل شحنة سالبة أما إذا تغيرت درجة حموضة الوسط إلى درجة أكبر من IEP إلى الجهة القاعدية فإن أيونات الهيدروجين في مجموعة الأمين NH_3^+– تتحرر إلى الوسط لمعادلة الوسط القاعدي وبالتالي يصبح لتلك المكونات قابلية للصبغة القاعدية لتكوين روابط أيونية.

تفسير للصبغة الروتينية هيماتوكسلين وأيوسين H&E Stain:

يمكن تفسير صباغة الأنوية بالهيماتوكسلين أن درجة حموضة الهيماتوكسلين كمحلول صبغة أقل من 7 وعلى درجة حموضة أقل من 7 فإن جزيء الـ DNA والمادة الكروماتينية تتآين فتفتقد أيونات الهيدروجين حيث تصبح محصلة الشحنة لتلك المكونات حامضية (سالبة الشحنة) ترتبط مع الهيماتوكسلين والذي يحمل شحنة للبروتينات في السيتوبلازم تكون موجبة وحيث أن شحنة الصبغة موجبة فإن السيتوبلازم لا يتقبل صبغة الهيماتوكسلين أما إذا كانت درجة حموضة الهيماتوكسلين قاعدية فإنها تصبح غير فعالة لأنها سوف تصبغ السيتوبلازم أيضا.

أما **الأيوسين** فإن درجة حموضته أقل من 7 أيضا فإنه سوف يصبغ مكونات السيتوبلازم لأن بروتينات السيتوبلازم كما ذكرنا تآينها على درجة حموضة أقل من (7) يكون قاعدي (موجبة الشحنة) وحيث أن صبغة الأيوسين تحمل شحنة سالبة فإنه سوف تتفاعل تلك المكونات مع الأيوسين لتكون روابط أيونية أيضا.

وبالإضافة للروابط الأيونية فإن هناك روابط أخرى تتكون بين الصبغات والمكونات النسيجية منها الروابط التساهمية (التشاركية) والروابط الهيدروجينية وقوى فان ديرفال.

ومن المعروف أن درجة التردد IEP لجزيء الـ DNA أقل من 7 أما البروتينات فإن IEP لها أكبر من 7.

نتيجة:

ومما سبق نستنتج أن كل الصبغة والمكونات النسيجية تتأين وتتفاعل فيما بينها بطريقة التفاعل المباشر (الصبغة المباشرة) (Direct Stain).

حيث أن المكونات النسيجية التي تحمل شحنة موجبة (قاعدية) تتفاعل مع الصبغة التي تحمل شحنة سالبة حامضية فإنها تتفاعل مع الصبغة التي تحمل شحنة موجبة (قاعدية).

أما في حالة الصبغة غير المباشرة (Indirect Stain) فإن المرسخ هو الذي يحمل الشحنة بدل من الصبغة ويرتبط مع المكونات النسيجية التي تحمل شحنة مخالفة مثل الهيماتوكسلين حيث أن الشحنة الموجبة للصبغة يعود للمرسخ وليس للصبغة.

طرق الصبغة

الصبغة التقدمية والصبغة التراجعية

1. **الصبغة التقدمية: Progressive Stain**: وهي الصبغة التي تزيد فعاليتها مع الزمن حيث توضع الشرائح في الصبغة لوقت معين ويجب فحص الشريحة عند إنتهاء الوقت تحت المجهر لمعرفة وقت إنتهاء الصبغة ويقل الوقت مع قدم الصبغة بشكل تدريجي ويكون المرسخ في حالة وجوده قبل الصبغة أو خلالها ومثال عليها هيماتوكسلين ماير وهذه الطريقة في الصبغة لا تحتاج إلى عامل التمايز.

2. **الصبغة التراجعية: Regressive Stain**: وفي هذه الحالة تصبغ المقاطع النسيجية بدرجة أكبر (Over Stain) وبعدها توضع في محلول التمييز Differentiation لإزالة الصبغة الزائدة عن المكونات

النسيجية التي لا يراد صباغتها بتلك الصبغة وهذه الطريقة شائعة بدرجة أكبر من الصبغة التقدمية وهي أسهل من الناحية العملية وفيها يكون الصبغة والمرسخ منفصلات وغالبا يكون المرسخ بعد الصبغة وسيأتي شرح طرق التمييز للصبغة التراجعية بعد الإنتهاء من طرق الصبغة.

الصبغة المباشرة والصبغة غير المباشر

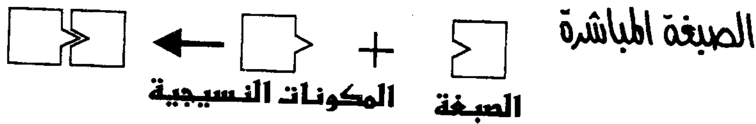
Direct and Indirect Stain

الصبغة المباشرة: Direct Stain: هي الصبغة التي تصبغ المكونات النسيجية مباشرة عند إذابتها في الماء أو الكحول ولا تحتاج إلى عوامل مرسخة مثل صبغة أزرق المثلين الأيوسين وغيرها.

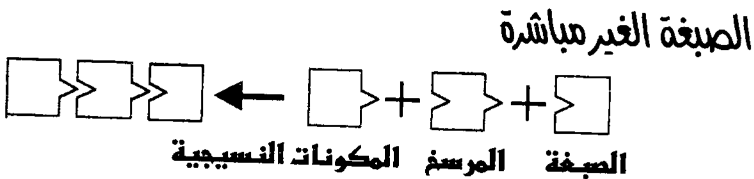
الصبغة غير المباشرة Indirect Stain: هي الصبغة التي تحتاج إلى عوامل مرسخة لصباغة المكونات النسيجية حيث تتكون مادة غير ذائبية من إتحاد الصبغة والمرسخ مع المكونات النسيجية وبالتالي لا تتأثر الصبغة عند غسل المقاطع بالماء أو تخفيفها بالكحول بعكس الصبغة المباشرة التي تتأثر بتلك العمليات وفي هذا النوع من الصبغة قد يكون المرسخ مع الصبغة في المحلول أو يستعمل قبلها أو يستعمل بعدها ومن المواد التي تستخدم كعوامل مرسخة شب الحديد Iron alum وشب البوتاسيوم Potassium Alum أو شب الأمونيوم Ammonium Alum بالإضافة إلى أملاح الحديد مثل كلوريد الحديديك Ferric Chloride ($FeCl_3$)

ويمكن توضيح الصبغة المباشرة والصبغة غير المباشرة بالأشكال التالية:

الصبغة المباشرة



الصبغة الغير مباشرة



الصبغة بإضافة مواد مقوية Accentuator: تكون المادة المضافة في هـذه الحالة غير ضرورية لإرتباط الصبغة مع المكونات النسيجية كما هو الحال في المرسخ وإذا تفيد في زيادة قوة الصبغة وزيادة خصوصيتها وتكون المادة المضافة أما قـاعدة أو حامض حيث تكون المادة قاعدية للصبغات القاعدية وحامضيـة للصبغـات الحامضية وبالتالي تزيد القوة الأيونية للصبغة مما يزيد قدرتها وخصوصيتـها ومـن الأمثلة على ذلك إضافة هيدروكسيد البوتاسيوم إلى صبغة أزرق المثلين وإضافـة الفينول (حامضي) إلى صفة Carbol Fuchsin.

الصبغة بإضافة مواد مسرعة Accelerators: مثل استخدام هيـدرات الكلور Chlolal Hydrat في صبغة الأنسجة العصبية بطريقة ترسـيب الفضـة حيث تزيد من سرعة ترسب الصبغة في الأنسجة.

الصبغة باستعمال مصائد الصبغة Trapping Agent: وهذه المواد تعمـل على مسك الصبغة في النسيج أو البكتيريا ومثال على ذلك صباغة مسحة من الـدم على شريحة تصبغه أزرق المثلين والايوسين تعـاد صبغـة أزرق المثلـين للمـادة الكروماتينية بعد معاملة الشرائح بمحلول يحتوي على حـامض Tannic Acid ومثال آخر هو صبغة الغرام للبكتيريا حيث أن دور محلول اليود في عملية الصباغـة هو منع خروج الصبغة من خلايا البكتيريا خلال عملية التمايز Differentiation.

التمايز: هو عملية يتم من خلالها إزالة الصبغة الزائدة أو غير المرغـوب فيها عن بعض المكونات النسيجية بهدف صباغتها بصبغات أخرى ومهمة بدرجـة كبيرة في الصبغات التراجعية Regressive Stains ويتـم أحيانـا أو لبعـض الصبغات باستخدام:

أ. محاليل بسيطة مثل الماء أو الكحول.

ب. محاليل حامضية مثل 1% كحـــول حـــامضي 1% Acid Alcohol.
(1مل حامض الهيدروكلوريك مضاف إلى 99مل كحول 70%).

ج. بعض المواد المرسخة تعمل كعامل تمايز مثل كلوريد الحديديك في صبغـــة PTAH (Phosphotungstic Acid Hematoxylin).

د. عوامل مؤكسدة.

هـ. بعض الصبغات تعتبر محاليل تميز الصبغات أخرى حيث تحل محلها.

طرق التمييز ومبادئها:

1) في حالة الصبغات المباشرة: وإذا كانت الصبغة تذوب في الماء أو الكحـول يعتبر الماء أو الكحول بتراكيز قليلة من عوامل التمييز ويعتمد ذلك على مبـــدأ الذائبية حيث أن ترك الشرائح بعد صباغتها بالصبغات المباشرة لفترة طويلـــة تؤدي إلى تفكك الروابط بين الصبغة والمكونات النسيجية مما يؤدي إلى إزالـــة الصبغة ومثال على ذلك صبغة الأيوسين للسيتوبلازم ولذلك يجب أن تكـــون عملية التجفيف سريعة وتكون الصبغة بدرجة أكبر من المطلوب أما الصبغـات غير المباشرة فلا تتأثر بتلك المحاليل.

2) في حالة الصبغات التراجعية: يكون دور محـــاليل التميـــيز الحامضيـــة أو القاعدية هو تكسير الروابط المتكونة بين الصبغة والمكونات النسيجية وتستعمل الصبغات الحامضية لتمييز الصبغات المحتوية على مرسخ ومثال علـــى ذلـــك استخدام محلول حامضي 1% Acid Alcohol في تمايز صبغة الهيماتوكسلين مثل هيماتوكسلين هارس حيث يعمل الحامض على تحطيـــم الروابـــط بـــين الهيماتوكسلين والمرسخ من خلال إعادة بناء مجموعة الهيدروكسيل في الصبغـة والتي اختفت من خلال اتحاد الهيماتوكسلين مع المرسخ كما أنه يعمل علـــى تثبيط الحالة التأينية الحامضية للنسيج وينتج على ذلك تحطيم الروابـــط بـــين المرسخ والمكونات النسيجية ومن الجدير بالذكر أن المحاليل الحامضية تســتخدم لتمايز الصبغات القاعدية والمحاليل القاعدية تستخدم لتمايز الصبغات الحامضية.

3) **استخدام المواد المؤكسد كعوامل تمايز:** فتعمل من خلال أكسدة الصبغة إلى مركبات لا لون لها وبالتالي يختفي لون الصبغة وتكون عملية الأكسدة بطيئة حيث أن المكونات النسيجية التي تأخذ كمية قليلة من الصبغة تتأكسد بشكل أسرع وبالتالي يختفي اللون منها أما المكونات النسيجية التي تحتوي على قدر أكبر من الصبغة فيبقى جزء كبير منها ومن الأمثلة على المواد المؤكسدة حامض البكريك والذي يستخدم أيضا كعامل مرسخ.

4) **استخدام المواد المرسخة في عملية التمايز:** فتعمل من خلال تكسير الروابط المتكونة بين الصبغة والمرسخ من جهة والمكونات النسيجية من جهة أخرى حيث تتحول المواد غير الذائبة إلى مكونات ذائبة مما يؤدي إلى اختفاء الصبغة أو ضعفها وذلك يعتمد على أن زيادة كمية المادة المرسخة في المحلول عنها في النسيج يؤدي إلى تكسر الروابط بين المرسخ والصبغة في النسيج ويبدأ إختفاء اللون أو الصبغة في السيتوبلازم أولا ثم من النواة وعندما يصل لون النواة إلى اللون المطلوب أو عندما تصبح الصبغة في حدود المطلوب وجيدة ويجب إزالة الشرائح من محلول التمييز وغسلها بالماء جيدا.

5) **تعمل بعض الصبغات كعوامل تمييز لصبغات أخرى:** عندما تكون قابلبية المكونات النسيجية أو بعضها لهذه الصبغة أكثر من الصبغة السابقة وتكون العملية بإحلال صبغة محل صبغة أخرى.

تفسير مبدأ عمل محاليل التمييز الحامضية والقاعدية:

يعتمد مبدأ عمل محاليل التمييز الحامضية والقاعدية على درجة الحموضة للمحلول حيث أن المحاليل الحامضية درجة حموضتها أقل من 7 وعلى هذه الدرجة تتأين البروتينات في السيتوبلازم إلى موجبة الشحنة مما يؤدي إلى تفكك الصبغة القاعدية عنها (الحوامض محاليل تميز للصبغات القاعدية) بينما بالنسبة لمحاليل التمييز

القاعدية فتعمل على تغيير حالة التأين للصبغة أو المكونات النسيجية كالتالي إضافة محلول قاعدي في التمييز يؤدي إلى الحد من تفكك مجموعات الأمين القاعدية ويزيد من تفكك أيونات مجموعات الكربوكسيل الحامضية وبالتالي يجعل البروتينات في السيتوبلازم والأنسجة العضلية سالبة الشحنة تتفكك عنها الصبغات الحامضية (المحاليل القاعدية محاليل تمييز للصبغات القاعدية).

العلاقة بين محاليل التثبيت وعملية الصباغة

1. تحافظ عملية التثبيت ومواد التثبيت المستخدمة على بعض المكونات النسيجية من خلال منع فقدانها في عملية المعالجة ومن الأمثلة على ذلك الدهون حيث أن بعض مواد الثنييت مثل أكسيد الأوزوميوم في حالة وجوده في محلول التثبيت أو إستخدام محاليل تثبيت تحتوي على دايكرومات البوتاسيوم فإنها تحافظ على الدهون وتمنع ذوبانها في الكحول أو الزايلين المستخدم في المعالجة بينما استخدام الفورمالين كمثبت لا يفيد في حفظ الدهون بينما يعتبر الفورمالين مثبت جيد للبروتينات بعكس دايكرومات البوتاسيوم أو حامض الأوزميك التي لا تعمل على حفظ البروتينات.
2. تزيد عملية التثبيت من قدرة النسيج على تقبل الصبغة حيث أنها تزيد من قابلية المكونات النسيجية لصبغة الهيماتوكسلين من خلال فصل مكونات المادة الكروماتينية في النواة إلى مكوناتها وهي الحامض النووي DNA وبروتين الهستون مما يمكن الصبغة من التفاعل مع الـ DNA وصباغته ومن مواد التثبيت التي تعمل على ذلك كلوريد الزئبق والفورمالدهيد والكحول الإيثيلي أما زيادة قابلية البروتينات أو السيتوبلازم للصبغة فتكون عند استخدام الفورمالدهايد أو كلوريد الزئبق قابلية النسيج أكثر للصبغة القاعدية لأنه يزيد من حامضيتها أما إذا كانت محاليل التثبيت تحتوي على حامض البكريك أو أكسيد الكروميوم فإنها تزيد من قابلية النسيج للصبغات الحامضية (تزيد من قاعدية تلك المكونات).

أما عند استخدام محاليل التثبيت التي تحتوي على الكحول أو حامض الخليك الثلجي فإنها تزيد من قابلية النسيج لكل من الصبغات الحامضية والقاعدية وتفسير زيادة قابلية المكونات النسيجية للصبغة بعد التثبيت يكون بأن محلول التثبيت الحامضي يؤدي إلى إغلاق مجموعة الكاربوكسيل في الحامض الأميني للبروتين مع الحافظ على مجموعة الأمين مما يجعل البروتين إيجابي الشحنة وبالتالي يتقبل الصبغة الحامضية أما إغلاق مجموعة الأمين ويحافظ على مجموعة الكاربوكسيل في الحامض الأميني تجعل البروتين سلبي الشحنة ويتقبل الصبغة القاعدية.

العوامل التي تؤثر على قوة الصبغة للأنسجة:

1. قوة الصبغة المستعملة وإعتمادها على عملية التثبيت ونوع المثبت وسبق تفصيله.
2. معدل تأين كل من المكونات النسيجية والصبغة.
3. درجة حموضة كل من المكونات النسيجية ومحاليل الصبغة.
4. ما إذا كانت محاليل الصبغة مائية أو كحولية.
5. درجة الحرارة التي تتم عليها عملية الصباغة.
6. مكونات الصبغة ما إذا كانت بسيطة أو معقدة.
7. تركيز الصبغة في المحلول.
8. نفاذية كل من الصبغة والمكونات النسيجية **بالإضافة إلى ما ذكر فإن شدة الصبغة تعتمد على عوامل أخرى منها:**
9. مدى شراهة أيونات الصبغة للمكونات النسيجية.
10. قوة الروابط المتكونة بينها ويفسر ذلك أن قوة حامضية مجموعة الكاربوكسيل ضعيفة مقارنة مع مجموعة الفوسفات والكبريتات

وهذا يعني أن الصبغات المحتوية على مجموعات كبريتيــــة مثــل Acid Fuchsin وصبغـــة "Orange G" فيــها قابليـــة للبروتينات ذات المجموعات القاعدية أكثر وتكون الروابط بينــها قوية حيث تحتاج إلى حوامض قوية لإزالتها بالإضافة لذلك فـإن شراهة هذه الصبغات للمكونات النسيجية كبيرة لدرجـــة أنها تستطيع أن تحل محل الصبغات الأقل منها شراهة والصبغات ذات المرسخ تعمل على نفس المبدأ.

* أما تفسير تأثير قوة الصبغة الناتجة عن تركيز الصبغة في المحلـول فيكون ناتج عن كمية الصبغة المتأنية وكمية الملـح الذائبيـــة في الصبغـة وبزيادة تركيز الصبغة تزيد كمية الصبغة المتأنية مما يزيد من عدد الروابـط التي تتكون بين المكونات النسيجية والصبغة أما زيادة كمية الأملاح الذائبة في الصبغة فإنه يضعفها حيث تنازع أيونات الصبغـــة علــى المكونـات النسيجية المتأنية.

لماذا تختلف المكونات النسيجية في تقبلها للصبغات؟

نظرية الإختيارية: تعتمد الإختيارية للصبغة على عـــدة عوامــل منها:

(1) عدد مناطق الإرتباط في المكونات النسيجية وقابليتها للصبغة ومثال علــى ذلك صبغة Sudan Black وهي صبغة غير متأينة لها قابليـــة لصباغـــة الدهون الموجودة في الأنسجة ولا تصبغ المكونات البروتينية المحيطة بها.

(2) اختلاف الشحنة بين المكونات النسيجية والصبغة حيث أن قوة انجـــذاب الصبغات الحامضية (التي تحمل شحنة سالبة) للمكونات النسيجية القاعدية (التي تحمل شحنة موجبة) كبيرة والعكس بالعكس أما قوة انجذاب الصبغة للمكونات النسيجية المتشابهة في الشحنة تكون ضعيفة جدا.

ومن الجدير بالذكر أن تكون درجة حموضة محاليل الصبغة القاعدية (التي تحمل شحنة موجبة) أو حامضية (أقل من7) وذلك لأن بروتينات السيتوبلازم والأنسجة العضلية عندها تتأين تأين موجب فلا تأخذ الصبغة القاعدية أما إذا كانت درجة الحموضة أكثر من 7 فإنها تتأين تأين سالب وتأخذ الصبغة القاعدية مما يصعب عنها تمييز مكونات النواة عن السيتوبلازم في الخلية.

(3) **النفاذية**: سرعة تخلل الصبغة للمكونات النسيجية حيث تتفاوت تلك السرعة بين صبغة وأخرى ومكونات نسيجية وأخرى ولذلك يجب التحكم بعامل الوقت عند الصباغة وخاصة في الصبغات التراجعية بالإضافة إلى التحكم بعامل الوقت للتمايز حيث تتفاوت سرعة خروج وتفكك الروابط بين الصبغات المختلفة أيضا ومثال على ذلك في الصبغة الثلاثية Masson Trichrome فإن سرعة تقبل الألياف الكولاجينية للصبغة الحامضية كبيرة بينما تكون متوسطة في الأنسجة العضلية وعند إستعمال محلول التمايز فإن تلك المكونات التي أخذت الصبغة بسرعة تفقدها بسرعة أيضا.

(4) **سرعة التفاعل بين المكونات النسيجية والصبغة**: ومثال على ذلك عند استعمال الـ Periodic Acid كعامل مؤكسد حيث أن الزمن يحدد عدد مجموعات الألدهايد المتكونة ونوع المركبات المتأكسدة.

(5) سرعة التفكك بين الصبغة والمكونات النسيجية وخروجها خلال عملية التمايز حيث تختلف هذه السرعة بين صبغة وأخرى وتعتمد سرعة التفكك وخروج الصبغة من المكونات النسيجية **عدة عوامل منها**:

أ. سمك المقاطع النسيجية.

ب. عملية التحريك أو حركة المكونات النسيجية والمقاطع خـــلال الصبغة.

ج. درجة الحرارة التي يتم عليها التفاعل.

د. وجود فجوات في الأنسجة.

أنواع التلون والتصبغ:

تقسم الصبغات من حيث تلوينها للمكونات النسيجية وعـــدد الألـــوان الناتجة عن الصبغة الواحدة في المكونات المختلفة إلى **عدة أقسام منها:**

1. Orthochromasia (التلون الوحيد) حيث تصبـــغ تلـــك الصبغـــات مكونات نسيجية معينة باللون الحقيقي للصبغة (نفس لون الصبغة).

2. Metachromasia (التبدل اللوني) حيث تلون الصبغة بعض المكونـــات النسيجية بلون مخالف للون الصبغة حيث تعمل تلك المكونات على تغيـــير الصبغة فيها وتعرف تلك الصبغة بإسم Chromotropes حيث يتغـــير اللون الأزرق إلى الخمري إلى الأحمر على الأغلب تكون تلك المركبـــات كبيرة ولها مناطق إرتباط عديد ونشيط مع الصبغـــة ومنـــها الأنســـجة الغضروفية والمواد المخاطية وحبيبات خلايا Mast حيث تحتـــوي تـــلك المكونات على مواد سكرية مخاطيـةMucopoly Saccharide ومـــن الأمثلـــة علـــى تلـــك الصبغـــات صبغـــة (Thionin) وصبغـــة Toulidine Blue.

3. Allochromasia (التلون المتعدد): حيث تتلون المكونات النســـيجية المختلفة أو بعضها بألوان مختلفة عند استخدام نفس الصبغة ومثال عليـــها صفة أزرق المثليـــن وصبغة Toluidine Blue حيث أنها تصبغ المـــادة الكروماتينية والأنسجة الغضروفية باللون الأزرق بينما تصبـــغ الميوســـين باللون الاحمر.

تصنيف الصبغات الصناعية

تقسم الصبغات الصناعية من حيث المجموعة الملونة (مساعد اللـــــون) إلى **ثلاث مجموعات وهي:**

أ. مجموعة الكوينونين Quininonoinring.

ب. مجموعة AZO group.

ج. مجموعة نيترو Nitro-group.

وأهم تلك المجموعات هي مجموعة الكوينونويد (quinonoid) حيـــــث تقسم أيضا إلى مجموعات فرعية حسب نوع المجموعة، أما من الناحية الصناعيـــــة فتقسم الصبغات من حيث:

أ. **طبيعة العمل:** إلى صبغات حامضية أو صبغات قاعدية.

ب. **حسب نوع المرسخ** المستخدم.

ج. **حسب طريقة الصبغة:** مباشرة أو غير مباشرة.

والمشكلة لا تكمن في تصنيف الصبغات فقط وإنما في تسميتها حيـــث أن بعض الصبغات سميت نسبة إلى لونها مثل Light Green وبعضها يتبعها حـــرف مثل:

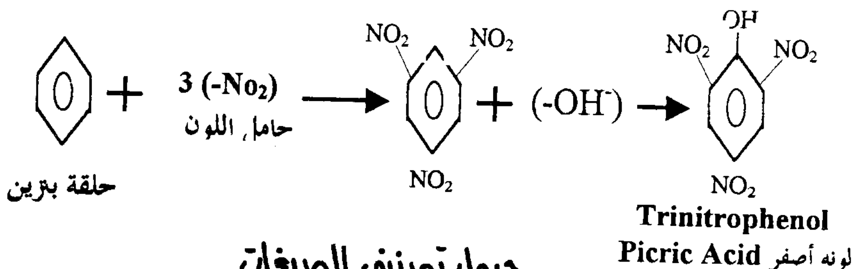
R- وتعنى أشد حمرة.

B- وتعنى يميل إلى الأزرق.

G- وتعني gelb.

Y- تعنى يميل إلى الصفرة (الأصفر).

وبعضها يتبعها أرقام لاتينيه للتفريق مثل Sudan IV، ومن الأمثلة علـــى الصبغات الصناعية حامض البكريك Picric Acid وتركيبه كالتالي:



جدول تصنيف الصبغات

المجموعة الملونة Chromophores	التركيب Structure	صبغات قاعدية	صبغات حامضية
I. Qunonoid Ring	Triaryl methane	مثل Rosaniline Dyes Crystalviolet	Acid Fuchsin Aniline Blue
	Haematin		Haemeten
	Xanthene	Pyronin مثل	Eosin Phloxine
	Thiazine	Thionin مثل Methylene Blue	
	Oxazine	Cresyle مثل Violet Celestine Blue	
II. AZO-Group	Azur Monazo	Neutral مثل Red, Safranin	Azocurmine Orange G مثل Tartrazine
	Diazo	Bismak Brown	Congored Biebrich Scarlet
III. Nitro Group	Nitro		Picric Acid Martus Yellow

صبغة الأنوية والسيتوبلازم صبغة هيماتوكسلين وأيوسين H&E Stain

★ صبغات الأنوية Nuclear Stains:

* **صبغة الهيماتوكسلين:** سبق أن ذكرنا عن مصدر الهيماتوكسلين وتصنيفه في الصبغات الطبيعية ويستعمل الهيماتوكسلين لصباغة كل من الأنوية والألياف المرنة وألياف الفايبرين والخلايا العصبية NeurogLial وألياف الخلايا العضلية المخططة.

وهناك عوامل عديدة تؤثر على قدرة الهيماتوكسلين وسرعة صباغة منها:

أ. كمية الهيماتوكسلين المؤكسد إلى هيماتين أو النسبة بين الهيماتوكسلين إلى الهيماتين حيث أن زيادة نسبة الهيماتين عن الهيماتوكسلين في المحلول لها أثر سلبي على الصبغة وسيأتي تفصيل ذلك في أكسدة الصبغة والعوامل المؤكسدة.

ب. نوع الهيماتوكسلين المستخدم ويعتمد على طريقة تحضيره حيث أن بعض الأنواع تصبغ بشكل أسرع وسيتم بيان ذلك عند ذكر طرق تحضير الهيماتوكسلين.

ج. درجة الحرارة التي تتم عليها عملية الصباغة.

د. نوع المثبت المستخدم ومدى جودة عملية التحضير للمقاطع النسيجية ولمعرفة فعالية الصبغة بعد تحضيرها يمكن صباغة مقطع نسيجي محضر من عينة من الزائدة الدورية مثبتة بالفورمالين فإذا ظهرت ألوان الأنوية باللون الأزرق فهذا يعني أن الصبغة جيدة أما إذا ظهرات الأنوية بلون باهت والسيتوبلازم بلون رمادي فهذا يعني أن الصبغة رديئة ويجب حفظ محلول الصبغة غير المستعمل Stock Solution في زجاجة داكنة وفي مكان بارد لتقليل عملية الأكسدة الطبيعية (التعتيق).

أكسدة الهيماتوكسلين: تتم عملية الأكسدة بطريقتين:

أ. **الأكسدة الطبيعية (التعتيق)**: حيث يترك محلول الصبغة لفترة طويلة بعد تحضيره قد تصل إلى عدة أسابيع أو أشهر ويكون محلول صبغة الهيماتوكسلين المحضر بهذه الطريقة جيد من حيث الفعالية ويدوم إستعماله لفترة طويلة قبل أن يفقد فعاليته ولكن تكمن المشكلة في عدم القدرة على إستعماله قبل عدة أشهر من تحضيره ومثال على هذه الطريقة هيماتوكسلين إيرلخ.

ب. **الأكسدة الكيماوية**: وتتم العملية بإضافة مواد كيماوية مؤكسدة وتكون كمية المواد المؤكسدة دقيقة وحسب أنواع أو طرق تحضير الهيماتوكسلين ومعدل تأكسد الصبغة يتأثر بعدة عوامل منها:

1. نوع المذيب المستخدم حيث أن الأكسدة في الكحول تكون أبطأ منها في الماء وإضافة الجلسرين تبطئ عملية الأكسدة بدرجة أكبر.
2. درجة حموضة المحلول حيث أن المحلول المتعادل من حيث درجة الحموضة تكون الأكسدة سريعة بينما تكون بطيئة في الوسط الحامضي وسريعة جدا في الوسط القاعدي لذلك يضاف الحامض لمحلول الصبغة لإبطاء عملية الأكسدة.

- ومن الجدير بالذكر أن كفاءة الصبغة تعتمد كما قلنا على النسبة بين الهيماتوكسلين الي الهيماتين حيث تكون الصبغة أفضل ما يكون عندما تكون النسبة 4:6 وتقل كفاءتها كلما قلت النسبة وإذا نقصت النسبة بدرجة كبيرة فإنه يعني أن الصبغة أصبحت غير فعالة وذلك لأن الهيماتين المتكون يتأكسد أيضا إلى مادة غير ذائبة.

- بالنسبة للون الصبغة يكون لــون الهيماتوكسلين في الوسط الحامضي حمري (أحمر قاني) أما في الوسط القاعدية فيكون اللون أزرق بينما يكون اللون في الوسط المتعادل أحمر فاتح ومن الناحية العملية فإن الهيماتوكسلين يكون أفضل ما يمكن عندما يكـون حمري أما إذا تحول إلى اللون الأزرق فهذا يعني أن الصبغة غـير جيدة ويجب التخلص منها ولا تصلح للإستعمال أما إذا كـان اللون بني فإن فعاليته معدومة خلال عملية التحضير للصبغة يتغـير لون محلول الصبغة وهذا يدل على فعاليتها عمر الصبغة في الوسط الكحولي خمسة أضعاف عمرها في الوسط المـائي وذلـك لأن الأكسدة في الوسط الكحولي ابطأ منها في الوسط المائي.
- هناك طريقة أخرى لإختبار الصبغة غير المقطع النسيجي وتكـون بشكل أسرع وهي بإضافة بضع قطرات من الصبغة إلى كمية من الماء الجاري فإذا تحول اللون مباشرة إلى أزرق كحلي فهذا يعـني أن الصبغة جيدة أما إذا كان التغير بطيء أو بقي اللون كما هـو أحمر أو بني فهذا يعني أن الصبغة ضعيفة وغير فعالة.

استعمال المرسخ

على الرغم من أكسدة الهيماتوكسلين جزئيا وتكون مادة الهيماتين فـإن هذه المادة تكون حامض ضعيف قدرته على الصباغة ضعيفة ولا تتم بشكل جيـد إلا بإضافة المرسخ وذلك لأن الهيماتين صبغة حامضية وتركيبه الأنويـة حامضيـة أيضا لذلك يعمل المرسخ على الربط بين الهيماتين والأنوية ويمكن تلخيص المـواد المرسخة حسب نوع المكونات النسيجية المراد صباغتها وبشكل جيد.

المكونات النسيجية	المرسخ
1. الأنوية	* أملاح الألمنيوم، الحديد، التنجستون.
2. غشاء الميلين في الأنسجة العصبية	* أملاح الكروم، الحديد، النحاس.
3. الألياف المرنة	* أملاح الحديد.
4. الخلايا العصبية	* أملاح التنجستون.
5. المحور الإسطواني للخلايا العصبية	* أملاح الرصاص.
6. المواد المخاطية Mucous	* أملاح الحديد.
7. الفايبرين Fibrin	* أملاح التنجستون.

عند إضافة المرسخ للهيماتوكسلين يكون لون الصبغة النهائي حسب الجدول التالي:

المرسخ	لون الهيماتوكسلين
1. النحاس	* أخضر مزرق.
2. النيكل	* ليلكي.
3. الخارصين	* أحمر.
4. الرصاص	* بني غامق.
5. البزموث	* إرجواني.
6. الحديد	* أسود.
7. الألمنيوم	* بنفسجي
8. البوتاسيوم	* أزرق

أنواع وطرق تحضير الهيماتوكسلين:

هناك عدة طرق لتحضير صبغة الهيماتوكسلين ولكـــل طريقـــة مزايـــا ومواصفات خاصة ومن هذه الطرق:

I) أنواع تحضر باستعمال شب البوتاسيوم أو الأمونيوم كمرســـخ وتســـمى (Alum Hematoxylin) وتشـــمل اولا: طريقـــة إيـــرلخ (EHRLICH'S hematoxylin) وتستخدم بدرجة كبيرة في الناحيـــة العملية، وهي صبغة تراجعية أي تحتاج إلى عملية التمايز بعدها.

المواد المستخدمة في التحضير	الكمية	الهدف
هيماتوكسلين	2غم	الصبغة
إيثانول مطلق	100مل	وسط كحولي يبطئ من سرعة عملية الأكسدة مما يطيل في عمر الصبغة.
جلسرين	100مل	يبطئ من عملية الأكسدة ويحافظ على الصبغة.
ماء مقطر	100مل	وسط مذيب
حامض الخليك الثلجي	10مل	يجعل الوسط حامضي لإعطاء فعالية جيدة للصبغة
شب البوتاسيوم (Alum)	15غم	عامل مرسخ

طريقة التحضير:

يذاب الهيماتوكسلين في الكحول الإيثلي وبعدها تضاف المواد الأخـــرى حسب الترتيب وعملية التعتيق هنا طبيعية أي الأكسدة طبيعية ويمكـــن أكســدة الصبغة كيماوية بإضافة 0.3 غم من أيودات الصوديوم وبعدها يتم فحص الصبغــة فإذا كانت مناسبة يغلق الوعاء بإحكام لوقت الإستعمال أما في حالــة الأكســدة الكيماوية فيمكن استعمال الصبغة فور تحضيرها وتكون الأكسدة بفقــد ذرتــين هيدروجين من جزئ الهيماتوكسلين.

- أهمية الجلسرين في محلول الصبغة حيث يعمل على ثبوت الصبغــة ويمنــع تبخرها وفي نفس الوقت يعمل على إبطاء عملية الأكسدة مما يجعل الصبغة تدوم لوقت أكثر عند استعمالها حيث تظل فعالة لعدة أسابيع.
- يمكن استبدال شب البوتاسيوم بشب الأمونيوم ويعطي نفس الكفاءة.
- يصبغ الهيماتوكسلين بهذه الطريقة بالإضافة للأنوية المواد المخاطية عديــدة التسكر Mucopoly Saccharide في الأنسجة الغضروفية والمواد البينيــة في أنسجة العظام كما يصبغ الكالسيوم في الأنسجة المتكلســـة بـــاللون الازرق ولذلك يفضل هذا النوع من الهيماتوكسلين بصباغــة الأنســجة الغضروفية وأنسجة العظام والأنسجة المثبتة لفترة طويلة.

ثانيا: طريقة ماير Mayer's Hematoxylin: صبغة تقدمية: وتعتبر هــذه الطريقة أو الصبغة الأكثر استخداما من الناحية العملية بالإضافة إلى صبغة إيـــرلخ ولكن لا تفيد هـــذه الطريــق بصباغــة المــواد المخاطيــة عديــدة التســكر Mucopolysaccharide كما هو الحال في صبغة إيرلخ وتتم عمليــة الأكســدة بإضافة مادة كيماوية مؤكسدة مثل أيودات الصوديوم.

المواد اللازمة	الكمية	الهدف
ماء مقطر D.Water	1000مل	مذيب
شب الأمونيوم أو البوتاسيوم (Alum)	50 غم	عامل مرسخ للصبغة
هيماتوكسلين (بودرة) Hematoxylin	1 غم	الصبغة
حامض الستريك Citric Acid	1غم	يجعل الوسط حامضي ليعطي فاعلية جيدة للصبغة.
هيدات الكلور Chloral hydrate	50 غم	مادة حافظة لمنع العفن.
أيودات الصوديوم	0.2 غم	عامل مؤكسد أكسدة كيماوية.

طريقة التحضير:

تذاب المواد الكيماوية المذكورة وحسب الترتيب ويجب التأكد من ذوبان كل مادة بشكل كامل قبل إضافة المادة الأخرى ويمكن ذلك باستعمال المحرك المغناطيسي (Magnatic Stirer) وتغير اللون خلال عملية التحضير يدل على جودة الصبغة واللون النهائي يجب أن يكون (حمري) وتبقى الصبغة جيدة لأشهر.

ثالثا: طريقة هاريس Haris – Hematoxylin: صبغة تراجعية:

تعتبر من أقوى أنواع الهيماتوكسلين من حيث السرعة في الصباغة وأفضلها لصباغة الأنوية حيث تعطي تفاصيل واضحة لمكونات النواة ولذلك يفضل استعمال هذه الطريقة في صباغة الأنوية للعينات الخلوية (Cytology) ولصباغة الكروموسومات وخاصة لدراسة جسم بار Barrbody وتتم عملية الصباغة بشكل سريع (2–5) دقائق.

المواد اللازمة	الكمية	الهدف
هيماتوكسلين	1 غم	الصبغة
كحول إيثيلي مطلق	10 مل	يبطئ عملية التأكسد
شب البوتاسيوم	20 غم	عامل مرسخ
ماء مقطر	200 مل	مذيب
أكسيد الزئبق	0.5 غم	عام مؤكسد

طريقة التحضير:

يذاب الهيماتوكسلين في الكحول ثم يضاف إلى محلول شب البوتاسيوم المذاب في الماء الساخن ثم يتم غلي المحلول بسرعة وبعدها يضاف أكسيد الزئبق عندما يصبح لون المحلول أرجواني غامق يبرد المحلول بسرعة تحت الماء الجاري ويرشح المحلول قبل الإستعمال.

وقد اقترح مالوري إضافة 8مل من حامض الخليك الثلجي للصبغة بعد أن تبرد وذلك لتحسين اللون ويجب تحضير الصبغة في إناء عنقه رفيع لمنع انتشار الصبغة عند إضافة كلوريد الزئبق.

رابعا: طريقة كولي Cole's Hematoxylin: تعتبر هذه الصبغة جيدة ولكن تحتاج إلى فترة طويلة 10 دقائق أو أكثر.

المواد اللازمة	الكمية	
هيماتوكسلين	1.5 غم	**محلول اليود**
يود	1 غم	
كحول 95%	50 مل	
شب الأمونيوم	محلول مشبع 700 مل	
ماء مقطر	250 مل	

طريقة التحضير:

يذاب الهيماتوكسلين في كمية 250 مل الماء الساخن ثم يخلط مع محلــول اليود (المذاب في الكحول الإيثيلي) ثم يضاف محلول (شب البوتاسيوم) ويســـخن المحلول حتى الغليان يبرد مباشرة تحت الماء الجاري ثم يرشح.

خامسا: طريقة كارازي: طريقة جيدة خاصة لحالات القطع المجــمد (Section Frozen):

المواد اللازمة	الكمية
هيماتوكسلين	1 غم
جليسرول	100 مل
شب البوتاسيوم	25 غم
ماء مقطر	400 مل
أيودات البوتاسيوم	1 غم

طريقة التحضير:

يذاب الهيماتوكلين في الجلسرول ثم يذاب شب البوتاسيوم في معظم حجم الماء على مدار الليل (Overnight) ثم يضاف محلول الشب ببطـــئ إلى محلـــول الهيماتوكسلين ويمزج جيدا بعد كل إضافة ثم يضاف أيودات البوتاسيوم إلى بقيـــة الماء ثم يضاف إلى المحلول السابق ويحرك بشكل جيد.

- وعلى الرغم من جودة أنواع الهيماتوكسلين المحضر بإضافة شـــب البوتاسيوم أو الأمونيوم كعامل مرســـخ إلا أن مســـاوئ هـــذه الأنواع هو تأثر هذه الصبغات بالمحاليل الحامضية الموجـــــودة في الصبغات الأخرى والتي تستعمل بعد هذه الصبغة مثـــل صبغـــة Van Geson أو الصبغة الثلاثية Masson Trichrome فـإن تأثير حامض البكريك أو الفوكسين الحامضي يجعل الأنوية بلـــون باهت ولذلك يفضـــل في هـــذه الحـــالات اســـتعمال أنـــواع الهيماتوكسلين التي يستخدم فيها شب الحديد أو أملاح الحديـــد كعامل مرسخ لأنـــه يقـــاوم تأثـــير تلـــك الحوامـــض علـــى الهيماتوكسلين.

II) أنواع الهيماتوكسلين المحضرة باستعمال شب الحديد أو أملاحه كعـــامل مرسخ Ironhematoxylins:

وسميت كذلك لاستخدام كلوريد الحديديك أو شب الحديد بـــدل مـــن شب البوتاسيوم أو الأمونيوم كمرسخ ولأن كل من شـــب الحديـــد وكلوريـــد الحديديك يعمل كعامل مؤكسد بالإضافة لكونها عوامل مرسخة فإنه لا حاجـــة لإضافة عامل مؤكسد للصبغة لأن الهيماتوكسلين يتأكسد من قبل هذه المـــواد إلى هيماتين وهذا يعني أن عمر الصبغة قليل إذا كانت ممزوجة مع المرســـخ في نفـــس

المحلول ولذلك يجب أن تبقى الصبغة ومحلول الترسيخ منفصلين ولا تمزج إلا عند الاستعمال بالإضافة إلى ما ذكر فإن هذه المواد وهي شب الحديد وكلوريد الحديديك وكونها مواد مؤكسدة تعمل عمل محلول التمايز للصبغة أيضا ولذلك تستخدم محاليل هذه المواد كمحاليل تمايز بعد الصبغة وتتميز هذه الصبغات عن صبغات شب البوتاسيوم والأمونيوم بأنها جميعها صبغات تراجعية وبالتالي يجب فحص الشريحة مجهريا لمعرفة اكتمال عملية الصبغة وخاصة بعد استعمال محلول التمايز كما أنها تستخدم لأغراض كثيرة جدا ولكنها تحتاج إلى وقت أطول وجهد أكبر **ومن هذه الصبغات:**

أولا: صبغة Heiden Hain's Iron Hematoxylin:

صبغة تراجعية وهي صبغة جيدة للخلايا التقشرية Cytology وتفيد بدرجة كبيرة في دراسة المقاطع النسيجية الرقيقة جدا حيث أنها تستخدم لتمييز المادة الكروماتينية والكروموسومات والنويات والسنتروسوم والميتوكوندريا بالإضافة إلى ألياف العضلات المخططة والميلين والغشاء الخلوي للخلايا.

1. محلول المرسخ يتكون من شب الحديد 5غم
ماء مقطر 100مل

ومن الجدير بالذكر أن شب الحديد يجب أن يكون على شكل بلورات بنفسجية اللون واضحة أما إذا كان لونها أصفر مخضر فهذا يعني أنها غير جيدة للإستعمال ويجب إذابة شب الحديد في ماء ساخن.

2. محلول الصبغة
هيماتوكسلين 0.5 غم
أيثانول مطلق 10 مل
ماء مقطر 90 مل

طريقة التحضير:

يذاب الهيماتوكسلين في الكحول ثم يضاف الماء المقطر ويترك محلول الصبغة للتعتيق عدة أسابيع وتحفظ بعدها في زجاجة محكمة الأغلاق لوقت الإستعمال.

طريقة العمل:

1. إيصال المقاطع النسيجية للماء لإزالة الشمع بالزايلين ثم الإماهة بتدرج كحولي تنازلي.
2. وضع الشرائح في محلول المرسخ لمدة ساعة.
3. غسل الشرائح بالماء المقطر.
4. وضع الشرائح في الصبغة لمدة ساعة.
5. غسل الشرائح بالماء المقطر.
6. تمييز الصبغة بوضع الشرائح في محلول التمييز وهو نفس محلول المرسخ لمدة 3-5 دقائق ثم غسل الشرائح بالماء الجاري لمدة عشرة دقائق.
7. الصبغة المتممة للسيتوبلازم مثل الأيوسين وإكمال العملية كالمعتاد والتجفيف بالكحول ثم التنقية بالزايلين.

ملاحظة:

حتى يكون التمايز جيدا يفضل تخفيف محلول المرسخ بحجم مكافئ من الماء المقطر.

ثانيا: صبغة Weigert's Iron Hematoxylin:

وتستخدم بدرجة أكثر في صباغة الأنوية إذا كانت المقاطع النسيجية موضوعة في محاليل حامضية قبل الصبغة مثل مقاطع العظام (لاستعمال محاليل نوع

الكلس الحامضية) أو سيتبع الصبغة استعمال محاليل حامضية أو صبغات حامضية وفي هذه الطريقة يكون المرسخ والصبغة منفصلين ولا تمزج إلا عند الإستعمال.

محلول (أ) المرسخ ويتكون من كلوريد الحديديك 3% 4مل

حامض الهيدروكلوريك 1مل

ماء مقطر 95مل

ويجب ترشح المحلول قبل الإستعمال:

محلول (ب) الصبغة هيماتوكسلين 1غم

ايثانول مطلق 100مل

يحتاج هذا المحلول إلى أربعة أسابيع للترسيخ (التعتيق قبل الإستعمال) ويجب ترك المحلولين منفصلين ويمزج كميتان متساويتان عند الإستعمال حيث تبقى فعالية الصبغة لإسبوعين أو ثلاثة ويجب أن يكون لون المزيج أسود إرجواني غامق أما إذا كان لون المزيج بني طيني فهو غير فعال.

ثالثا: صبغة Celestin – Blue- Alum:

المواد اللازمة	الكمية
سلستين أزرق (Celestin-Blue)	2.5 غم
شب الحديد	25 غم
جلسرين	7 مل
ماء مقطر	500 مل

يذاب شب الحديد في ماء بارد مع التحريك ثم يضاف Celestin-Blue إلى المحلول ويغلى المحلول لعدة دقائق وبعد التبريد ترشح الصبغة ويضاف إليها الجليسرين.

طريقة العمل:

1. توضع الشرائح بعد وصلها للماء في المحلول السابق لمدة خمسة دقائق.
2. تغسل الشرائح في الماء المغلي.
3. تصبغ الأنوية بالهيماتوكسلين مثل مايرهيماتوكلسين.
4. تكمل الصباغة حسب المطلوب Counter Stain.

الصبغة المتممة Counter Stain

"صبغات السيتوبلازم" (Cytoplasmic Stains):

الصبغة الرئيسية والأكثر استخداما لصباغة السيتوبلازم هي صبغة الأيوسين ولأن العديد من الصبغات تصبغ مكونات مقاطع نسيجية معينة في الخلايا والأنسجة فلابد من صباغة الخلفية (Back Ground) مخالف للتمكن من تمييز تلك المكونات بسهولة وبحيث أن تلك الصبغة الثانوية لا تؤثر على الصبغة الرئيسية مما يسهل عملية تشخيص المقاطع النسيجية ودراستها مجهريا وقد يستعمل أكثر من صبغة متممة واحدة وتقسم الصبغات المتممة حسب اللون إلى ثلاثة أقسام هي:

1. **أقسام الصبغات المتممة مع أمثلة عليها السيتوبلازم:**

صبغات متممة ذات لون أحمر	صبغات متممة ذات لون أصفر	صبغات ذات لونان
أيوسين y	حامض البكريك	Light Green
أيوسين B	Metanil Yellow	Fast Green
فلوكسبين B Biebrich Scarlet	Orange G	

2. أما صبغات الأنوية المتممة فتقسم أيضا من حيث اللون إلى:

صبغات ذات لون أحمر	صبغات ذات لون أزرق
Neutral Red	Methylene Blue
Safranin	Toluidine Blue
Carmin	Celestin Blue

صبغة الأيوسين:

الأيوسين تعني الوردي لأنه يصبغ بعض المكونات النسيجية باللون الوردي أو الزهري، Pink Color وخاصة الأنسجة المثبتة بشكل جيد حيث يصبغ الأنسجة الضامة والسيتوبلازم بشكل متدرج حيث أنه يعطي تفاصيل جيدة ويمكن الإعتماد عليه في التمييز بين المكونات النسيجية وكما هو معروف فإن هذه الصبغة مع الهيماتوكسيلين تعرف بصبغة Hematoxylin and Eosin وتختصر بـ H&E Stain وهي الصبغة الرئيسة والأكثر استخداما في دراسة المقاطع النسيجية.

والأيوسين من مجموعة الزانثين (Xanthene Group) وهو مشتق من الفلورسين (Fluorescein) ومتوفر على نوعين Eosin Y و Eosin B من الناحية العملية ويذوب في الماء بدرجة أكبر من ذوبانه في الكحول ويستخدم للصباغة بتركيز 1% ولمنع نمو العفن يمكن إضافة كمية قليلة من الثايمول أو إضافة بضع قطرات من الفورمالين للصبغة.

ولصباغة الأنسجة المثبتة في الفورمالين بصبغة الأيوسين بشكل أفضل يمكن وضع الشرائح قبل الأيوسين في محلول مشبع من كلوريد الزئبق لمدة 2-3 دقائق لأن أملاح الزئبق ترتبط مع المكونات النسيجية التي تحمل شحنة سالبة فتبقى المكونات النسيجية التي تحمل شحنة موجبة حرة فيزيد إرتباطها بالصبغة والتي تحمل شحنة سالبة أي أنها تزيد من قاعدية السيتوبلازم.

طريقة تحضير الأيوسين Eosin Y- Phloxine B:

محلول 1% أيوسين		A) (Stock) Eosin (1%)
أيوسين Y (يذوب في الماء)		1غم
ماء مقطر		100 مل
محلول الفوكسين B	B (Stock)	B) 1% Phloxine
فلوكسين B	1غم	
ماء مقطر	100 مل	
المحلول العملي		(Working Solution)
1% إيوسين		100 مل
1% فلوكسين B		10 مل
إيثانول 95%		780 مل
حامض الخليك الثلجي		4 مل

ملاحظة:

ذائبية الأيوسين في الماء 44%   ذائبية الأيوسين في الكحول 2%

طريقة تحضير صبغة اورانج جـ Orange G Stain:

صبغة أورانج جـ (بلورات)	1 غم
حامض الفوسفوتنجستك	5 غم
إيثانول 95%	100 مل

طريقة تحضير صبغة الأخضر السريع: Fast Green

الأخضر السريع (بلورات)	0.5 غم
زيت القرنفل	50 مل
كحول إيثيلي مطلق	50 مل

الناحية العملية من الصباغة

تتناول الناحية العملية في الصبغة أمرين هما طريقة تحضير الصبغات والمحاليل الأخرى اللازمة وطريقة الصبغة من الناحية العملية.

وقد تناولنا بالتفصيل طريقة تحضير محاليل الصبغات المختلفة ويمكن تحضير الصبغة المطلوبة والصبغة المتممة حسب المطلوب وحسب الطريقة المذكورة أما طريقة الصباغة العملية فيمكن تلخيصها بجدول يوضح الخطوات والوقت والهدف لكل خطوة.

خطوات الصبغة بالتفصيل:

1. **الخطوة الأولى:** التخلص من الشمع (Dewaxing) وحيث أن شمع البرافين في المقطع النسيجي لا يسمح للصبغة بالنفاذ إلى داخل الخلايا فلا بد من التخلص منه باستعمال مادة مذيبة مثل الزايلين حيث يتم وضع الشرائح بعد تجفيفها في وعائين يحتويان على الزايلين لفترة خمسة دقائق في كل وعاء.
2. **الخطوة الثانية:** التخلص من الزايلين ضروري لأن الصبغة لا تتجانس معه ويتم بوضع الشرائح في وعائين يحتويان على الكحول الإيثيلي المطلق ولأن الزايلين غير متجانس مع الماء فيجب أن يخلو الكحول من الماء والوقت المناسب لهذه الخطوة هو دقيقتين أو 20 غطة لكل منهما.

3. **الخطوة الثالثة: الإماهة Hydration**: ويكون بمعالجة المقاطع النسـيجية بوضعها أو إمرارها على تدريج كحولي تنـازلي يشـمل كحـول 95% في وعائين ثم كحول 70% في وعاء ثم في وعاء يحتوي على ماء مقطر دقيقتـين لكل منهما أو 20 غطة والتدرج الكحول التنازلي ضروري ولا يجـوز نقـل الشرائح مباشرة من الكحول المطلق للصبغة لأن ذلك يسبب تفسخ في المقاطع النسيجية وتفتتها وقد يسبب تساقطها وفي نهاية هذه الخطوة تصبح المقـاطع النسيجية منفذة بشكل جيد للصبغة لوجود تجانس بـين الوسـط الخـارجي للخلايا والوسط الداخلي لها.

ملاحظات:

في حالة تكون رواسب في المقاطع النسيجية ويجب معالجتها والتخلـص منها قبل البدء بالصبغة وتعتمد الطريقة على نوع الرواسب:

- أ. **رواسب الزئبق**: في حالة استخدام كلوريد الزئبق في محاليل التثبيت قـد تتكون رواسب تعرف بصبغات الزئبق Mercuric Pigment خـلال عملية التجفيف بالكحول يمكن التخلص من تلك الرواسب بمعالجة المقاطع النسيجية بمحلول يود تركيز 0.5% محضر بإذابة 0.5 غم يـود في 100 مل كحول إيثيلي تركيزه 70% لمدة 3-5 دقائق حيث يعمل اليود علـى إذابة تلك الرواسب وتتحول إلى مواد ذائبة ثم غسل الشرائح بالماء الجاري لمدة ثلاثة دقائق يتبعها معالجة المقاطع النسيجية بمحلول 5% ثيوسـلفات الصوديوم Sodium Thiosulfate 5% لإزالة لون اليود لمدة دقيقتـين وبعدها يتم غسل الشرائح بالماء الجـاري ثم تنقل إلى الصبغة.
- ب. **رواسب الفورمالين (Formalin Pigments)**: تتكـون تلـك الرواسب إذا تركت العينات لفترة طويلة في الفورمالين وتكون بني علـى

شكل حبيبات خارج الخلايا ويكثر وجودها في الأنسجة المحتوية على كميات كبيرة من الدم مثل الطحال فتتكون تلك الرواسب من تفاعل الفورمالين الحامضي (يصبح الفورمالين حامضي مع الزمن) مع مادة الهيماتين في خلايا الدم وللتخلص من هذه المشكلة يفضل استخدام الفورمالين على شكل فورمالين ملطف وفي حالة تكونها توضع الشرائح في محلول مشبع في حامض البكريك محضر من الكحول الإيثيلي لمدة عشرون دقيقة أو أكثر وبعدها تغسل بالماء وتستكمل الصبغة.

4. **الخطوة الرابعة: صباغة الأنوية بصبغة الهيماتوكسلين:** حيث توضع الشرائح في وعاء تحتوي على الصبغة ويختلف الزمن حسب نوع الصبغة وطريقة تحضيرها بالإضافة إلى الزمن الماضي على تحضيرها ونوع المثبت ويلي الصبغة غسل الشرائح في الماء الجاري للتخلص من الصبغة الزائدة، وقد يعمل الماء الجاري على تزريق اللون ولكن تحتاج إلى وقت طويل عشر دقائق أو أكثر ويمكن الإستعاضة عن ذلك بوضع الشرائح في محلول مشبع من كربونات الليثيوم لتزريق اللون عشرين غطة أيضا أو دقيقتين ثم تغسل المقاطع بالماء المقطر ثم توضع الشرائح في الكحول الإيثيلي بتركيز 80% لدقيقتين أو عشرين غطة لتهيئة الشرائح أو المقاطع لتقبل الأيوسين.
5. **الخطوة الخامسة: الصبغة الثانوية الإيوسين:** توضع الشرائح في الأيوسين لمدة 3-5 دقائق لصباغة السيتوبلازم وبعض المكونات النسيجية الأخرى باللون الأحمر أو الزهري.
6. **الخطوة السادسة: التجفيف** Dehydration: ولأن مادة التغطية غير متجانسة مع أي من الماء أو الكحول فلا بد من التخلص من المادة الموجود في المقاطع بتمرير الشرائح بتدرج كحولي تصاعدي 95% إيثانول مرتين لمدة 5-10 غطات في كل منهما ثم بوعائين يحتويان على كحول إيثيلي مطلق 5-10 غطات أيضا في كل منهما.

7. الخطوة السابعة: التنقية Clearing: بعد اكتمال عملية التجفيف توضع الشرائح في وعائين يحتويان على الزايلين للتخلص من بقايا الكحول لأنها غير متجانسة مع مادة التغطية ولمدة 10-20 غطة في كل منها ويجب عدم استخدام نفس المحاليل والسوائل المستخدمة في البداية.

جدول ملخص خطوات صبغة H&E

الخطوة	الوقت	الهدف
1. زايلين	5 دقائق	إزالة الشمع
2. زايلين	5 دقائق	
3. كحول مطلق	20 غطة	إزالة الزايلين
4. كحول إيثيلي مطلق	20 غطة	
5. إيثانول 95%	20 غطة	
6. إيثانول 95%	20 غطة	إماهة Hydration
7. إيثانول 70%	20 غطة	
8. ماء مقطر	20 غطة	
9. صبغة الهيماتوكسلين	15-30 دقيقة أو حسب الصبغة	صبغة الأنوية
10. ماء جاري	20 غطة	غسل الشرائح من الصبغة
11. محلول مشبع من كربونات الليثيوم 1%	20 غطة	تزريق اللون
12. ماء مقطر	20 غطة	التخلص من الزائد من كربونات الليثيوم

الخطوة	الوقت	الهدف
13. إيثانول 80%	20 غطة	التجفيف الجزئي
14. صبغة الأيوسين (الصبغة المتممة)	3–5 دقائق	صبغة ثانوية للسيتوبلازم
15. إيثانول 95%	5–10 غطات	التجفيف Dehydration
16. إيثانول 95%	5–10 غطات	
17. إيثانول 100%	5–10 غطات	
18. إيثانول 100%	5–10 غطات	
19. زايلين	10–20 غطة	التنقية والتخلص من بقايا الكحول+ التوضيح **Clearing**
20. زايلين	10–20 غطة	
21. تغطية الشرائح		

ويمكن توضيح الطريقة بأسلوب آخر وهي الكلمات والأسهم.

* **Xylene → Xylene → 100% Ethanol → 100% Ethanol**

↓

Xylene ← 100% Ethanol ← 95% Ethanol ← 95% Ethanol

↓

* Dw → 80% Ethanol → Eosin → 95% Ethanol ↓

95% Ethanol

↑ ↓

محلول كربونات الليثيوم **1%** ← ماء جاري ← Hematoxylin ← D.W ← 70% Ethanol

النتيجة:

المكونات النسيجية	اللون	الصبغة
الأنوية	أزرق	هيماتوكلسين
الأنسجة الغضروفية	أزرق فاتح إلى أزرق غامق	
Sulfated Mucopoly--saccharides	إلى زهري	
المواد البينية في العظام **Cement Material**	أزرق	
الكالسيوم والعظام المتكلسة	أزرق (أرجواني)	
الزوائد الخضري في العفن **Hyphae**	أزرق فاتح	

الصبغة	اللون	المكونات النسيجية
الأيوسين	أرجوانية	السيتوبلازم لبعض الخلايا مثل الخلايا العظمية **Osteocyte Cells** والخلايا البلازميه **Plasma Cells** والخلايا القاعدية **Basophil**
	أحمر أو برتقالي لامع	خلايا الدم الحمراء الحبيبات الحامضية في خلايا الدم البيضاء من نوع **Eosinophil** الكيراتين
	زهري متدرج الألوان	الستوبلازم
	زهري غامق	الألياف العضلية الماد البروتينية الموجودة في الغدة الدرقية، الألياف المرنة، انسجة العظام متروعة الكلس – الكولاجين
	زهري فاتح	الأنسجة الشبيهة بالعظم

ملاحظات عامة على عملية الصباغة

ملاحظة رقم (1):

العديد من المكونات النسيجية لا تتلون بصبغة الهيماتوكسلين والأيوسين منها ألياف الخلايا العصبية والمحور الإسطواني لها والنهايات العصبية والألياف الشبكية بالإضافة إلى بعض المكونات في السيتوبلازم مثل جهاز جولجي والميتوكندريا حيث لا يمكن تمييزها بهذه الصبغة وبالتالي تحتاج إلى صبغات خاصة لتمييزها.

ملاحظة رقم (2):

بالنسبة للبكتيريا تصبغ بهذه الصبغة باللون الأزرق أو الزهري وهذه الألوان ليس لها علاقة في تحديد نوع البكتيريا موجبة أو سالبة الغرام حيث أن هذه الصبغة لا تميز بينها.

ملاحظة رقم (3):

الوقت اللازم لصبغة الهيماتوكسلين يختلف حسب نوع الصبغة المستخدم وطريقة تحضيرها وبشكل عام يتأثر الوقت بعدة عوامل حيث تحتاج الصبغة إلى وقت طويل في الحالات التالية:

1. استخدام أملاح الكروم في محاليل التثبيت مثل محلول فلمنج يعيق صبغة الهيماتوكسلين.
2. تعرض الأنسجة المتكلسة لفترة طويلة من الوقت في محلول نزع الكلس الحامضي Decalcification Solution.
3. حفظ العينات لفترة طويلة في الفورمالين حيث يصبح الفورمالين حامضي مع الزمن ويعيق الصبغة.
4. حفظ العينات في كحول إيثيلي 70% لفترة طويلة. وفي تلك الحالات يفضل استخدام هيماتوكسلين من أنواع **Iron Hematoxylin** أو Celestin Blue- Hematoxylin أو تسخين الصبغة حيث تزداد فعالية الصبغة مع التسخين أو استخدام هيماتوكسلين إيزخ في حالة العينات العظمية متروعة الكلس لفترة طويلة من الحامض.

ملاحظة رقم (4):

عملية تزريق اللون هناك بدائل أخرى تستعمل منها استعمال الماء القاعدي ولأن بعض البلاد فيها المياه متعادلة أو حامضية فيمكن استخدام بديل Tap Water Substitute ويتكون:

ماء مقطر 1000 مل

بيكربونات الصوديوم 3.5 غم

كبريتات المغنيسيوم 20 غم

ثم يضاف عدة قطع من الثايمول لمنع نمو العفن حيث تتم عملية التزريق في وقت قصير 15-30 ثانية ويمكن استعمال محلول بيكربونات الصوديوم تركيز 2% بدل ذلك المحلول.

ملاحظة رقم (5):

بالنسبة لصبغة الأيوسين تختلف درجتها حسب المثبت المستخدم حيث أن الأنسجة المثبتة بمحاليل تحتوي على الكرومات أو حامض البكريك تأخذ صبغة الأيوسين بقوة وكذلك الأمر بالنسبة للأنسجة المعالجة بالحامض لنزع الكلس.

ملاحظة رقم (6):

يجب عدم استعمال نفس الزايلين والكحول قبل الصبغة وبعدها أي عدم استخدام الزايلين المستخدم لإزالة الشمع والكحول المستعمل في الإماهة Hydration لأغراض نزع الماء Dehydration والتنقية Clearing وذلك لأن عملية التجفيف بعد الصباغة ومع التكرار تؤدي إلى تخفيض تراكيز الكحول وبالتالي يصبح الكحول المطلق في النهاية بتركيز أقل مما يزيد نسبة الماء فيه وبالتالي عند استخدامه للتخلص من الزايلين في المقاطع النسيجية يسبب تعكر تلك المقاطع النسيجية أما عند استخدام الزايلين المستعمل للتخلص من الشمع في عملية التنقية بعد الصباغة فذلك يسبب تشوه المقاطع خلال التغطية Mounting لأنه مع استمرار عملية إذابة الشمع يصبح الزايلين مشبع بالشمع وكون الشمع غير متجانس مع مادة التنقية والتحميل فإنه يسبب تموج وتعكر المقاطع النسيجية المصبوغة.

ملاحظة رقم (7):

يجب تغيير المواد والمحاليل المستخدمة في الصباغة بشكل دوري وحسب كثافة العمل وعدد الشرائح والمقاطع المصبوغة لأن تلوث تلك المواد والمحاليل بدرجة كبيرة يسبب تعكر المقاطع النسيجية وتصبح الصبغة سيئة مما يسبب تداخل في الألوان بين الصبغات ويجب تغيير صبغة الهيماتوكسلين إذا تغير لون المحلول إلى اللون الأزرق أو تصبح فيه ترسبات بدرجة كبيرة أما محلول صبغة الأيوسين فيجب تغييره بشكل أسبوعي.

ملاحظة رقم (8):

يمكن ترك الشرائح بعد صباغة المقاطع النسيجية في الزايلين أو الكحول المطلق ويجب عدم تركها في كحول أقل تركيز من ذلك لأن ذلك يسبب تساقط المقاطع النسيجية عن الشرائح وقد تصبح الصبغة باهتة إذا بقيت المقاطع على الشرائح.

ملاحظة رقم (9):

عند استخدام هيماتوكسلين ماير يمكن صباغة مئات الشرائح يوميا ولمدة أسبوعين على الأقل بدون أن يتأثر المحلول أو يتغير أو يفقد فعاليته.

ملاحظة رقم (10):

أفضل درجة حموضة لصبغة الأيوسين هي بين 5.6-5.4 وهذا يعني أن الصبغة الحامضية تعطي نتيجة أفضل ومع الأيام تزيد درجة الحموضة مما يفقد الأيوسين قدرته على الصبغة بعد أسبوع أو أسبوعين.

ملاحظة رقم (11):

عند صباغة السيتوبلازم بصبغة الأيوسين يفضل زيادة الوقت عن المحدد أي (Overstaining) والتسريع في عملية التجفيف بالكحول وذلك لأن الكحول يعمل تمايز للصبغة.

ملاحظة رقم (12):

إذا احتوى المرسخ على مجموعة الكبريتات فإن عمر الصبغة يحدد مـدى قابلية النسيج للصبغة وذلك بسبب تكون حامض الكبريتيك في محلـول الصبغة والذي يعمل كعامل مؤكد للهيماتوكسلين.

ملاحظة رقم (13):

إذا كان الهدف من الصبغة هو تميـيز المقـاطع الخلايـا الحامضيـة Eosinophils يجب عمل تمايز بدرجة كبيرة لصبغة الأيوسين حيـث يزول لون الصبغة عن السيتوبلازم لجميع الخلايا باستثناء خلايا الـدم الحمراء وحبيبات الخلايا الحامضية Eosinophils.

الفصل السابع

تغطية الشرائح (التحميل) Mounting

تعريف التغطية:

هي وضع غطاء الشريحة على المقاطع النسيجية المصبوغة بعد وضع مادة صميغة لاصقة لتثبيت الغطاء على الشريحة وتتميز المادة اللاصقة بأنها مذابة في سائل درجة تطايره عالية مثل الزايلين أو التولوين ومع تبخر المادة المذيبة يزيد قوة تماسك الغطاء مع الشريحة وبذلك يصبح التحضير النسيجي للعينة بشكل دائم.

الطريقة:

توضع مادة التغطية الصمغية على غطاء الشريحة (قياس يناسب المقاطع) بحيث توزع بشكل طولي وبكمية مناسبة تم توضع الشريحة بالمقلوب (بحيث يكون وجه القطع للأسفل وبشكل مائل وتثبيت الشريحة عند حافتها بجانب الغطاء وتنزل بالتدريج فوق الغطاء حتى تلامسه حيث تتوزع مادة التغطية بين الشريحة والغطاء (بالإنتشار) حيث أنها متجانسة مع مادة التنقية وتقلب الشريحة مع الغطاء وتترك فترة قصيرة لإستكمال انتشار مادة التغطية وبعدها إذا وجدت فقاعات هوائية بين الشريحة والغطاء تخرج بواسطة ملقط رفيع بالضغط التدريجي بجانب الفقاعة ثم تترك لتجف فترة من الوقت على درجة حرارة الغرفة أو تجفيفها بسوعة على صفيحة ساخنة أو في مجفف أو في فرن.

أهداف التغطية:

1. منع جفاف المقاطع أي حتى تبقى رطبة (Wet).
2. حماية المقاطع النسيجية من التلف.
3. منع تأكسد الصبغة مع الزمن.
4. حفظ التباين في معامل الإنكسار الـ (Contrast).

مواد التغطية Mounting Media

تقسم من حيث المواد المذيبه أو المادة المذيبة إلى قسمين همـــــا:

مواد التغطية المائية ومواد التغطية الراتنجيه.

أولا: مواد التغطية المائية Aqueous Mounting Media وتقســـم إلى قسمين وهي:

1. **مواد التغطية الدائمة.**
2. **مواد التغطية المؤقتة.**

مواد التغطية المائية الدائمة

تستعمل هذه المواد لتغطية الشرائح في حالة تأثر الصبغـــة المســـتخدمة أو المكونات النسيجية المصبوغة بالكحول أو الزايلين مثل الدهون وبالتالي فإن الشرائح تنقل من الماء مباشرة إلى وسط التغطية ومن الأمثلة عليها:

أ. مادة التغطية	جليسرين جلي	Glycerine-Jelly
مكوناها		الهدف
جيلاتين	1غم	إعطاء الصلابة
ماء مقطر	60 مل	مذيب
جليسرين	70 مل	يبقي النسيج طرياً ويمنع التشقق
فينول أو ثايمول	0.25 مل	يمنع نمو العفن

طريقة التحضير:

يذاب الجيلاتين في الماء الساخن وعندما يبرد يضاف الجليسرين ثم يضاف الفينول أو الثيمول ثم يوضع في زجاجة وهو سائل وعند الإستعمال يوضع في الفرن أو حمام مائي حتى يذوب ثم يستعمل للصبغات المائية.

مميزاتها:

أ. تؤثر على الصبغة مع الزمن.
ب. تجف بسرعة وتصبح غير فعالة.
ج. تحتاج إلى تسخين قبل الإستعمال.

ب. مادة التغطية	أبائي	Apathy's Mounts
مكوناها:		
صمغ عربي (بلورات)	50 غم	إعطاء الصلابة
سكر	50 غم	زيادة معامل الإنكسار
ماء مقطر	50 مل	مذيب
ثيمول أو 1مل فورمالين مركز.	0.5 غم	لمنع نمو العفن

ويحضر بإذابة المواد بالتسخين الخفيف للماء ثم تحفظ في زجاجات وتتميز بأن معامل إنكسارها كبير ويمكن التخلص من هذه المشكلة بمضاعفة كمية الماء حيث يقلل من معامل الإنكسار وتعتبر من أفضل مواد التغطية المائية.

مواد التغطية المائية المؤقتة:

أ. مزيج من كميات متساوية من الجليسرين والماء يستعمل للصبغات المائية.

ب. **زيت خشب الأرز:** يستعمل في حالة وصول الشرائح للكحول وعدم وصولها للزايلين أو أي مادة تنقية أخرى، ويمكن أن تصبح دائمة بوضع شمع على حواف الغطاء أو وضع مادة المناكير حول الغطاء.

ثانيا: مواد التغطية الصمغية Resinous Mounting Media:

مواد التغطية الصمغية إما أن تكون طبيعية أو صناعية وفي كلتا الحالتين تكون مذابة بمادة مذيبة ذات تطاير عالي (Highly Volatile) مثل الزايلين أو التولوين.

مواد التغطية الصمغية الطبيعية:

حيث يأخذ الصمغ الطبيعي من شجر مثل بلسم كندا والصمغ العربي وتتميز مواد التغطية الطبيعية بمساوئ كثيرة وهي:

1. من الناحية الكيماوية تتكون من مزيج من المواد العضوية وليس مادة نقية.
2. تجف ببطئ.
3. يتحول لونها إلى الأصفر مع الزمن.
4. تتشقق مع الزمن نتيجة جفاف المادة المذيبة.
5. لأنه حامضي في التفاعل فإنه يتفاعل مع الصبغة وتصبح باهتة.

مواد التغطية الصمغية الصناعية

Synthetic Mounting Media

يفضل استخدامها أكثر من المواد الطبيعية وهي مواد صمغية صناعية مذابة في مواد عضوية عالية التطاير مثل الزايلين أو التولوين.

مميزاتها:

1. تركيبها الكيماوي معروف وهي ثابته من حيث التركيب ولا تتفاعل مع مواد أخرى.
2. ذائبيتها عالية في مواد كيماوية عضوية متطايرة مثل الزايلين.
3. ألوانها باهتة أو غالباً لا لون لها.
4. لا يتغير لونها مع الزمن ولا تتشقق ولا تتحبب.
5. تجف بسرعة.
6. تعطي قوة تماسك كبيرة بين الغطاء والشريحة.
7. متعادلة من حيث درجة الحموضة وبالتالي لا تتفاعل مع الصبغة.
8. لها معامل انكسار مماثل للزجاج لرؤية مكونات النسيج بشكل واضح

ومن الأمثلة على مواد التغطية الصناعية مادة D.P.X ومادة B.P.S ومادة الكلازين وهي جميعها متجانسة مع وسط الترويق.

أمثلة على مواد التغطية الصمغية وطريقة تحضير كل منها ومواصفتها

1. **مادة الكيركاتريك D.P.X** وهي اختصار للدسترين من مشتقات البولسترين. والبلاستزارز وهو (Tricresyle Phosphate) وهو مادة ملدنة والزايلين مادة مذيبة معامل إنكسارة 1.52 وتكمن أهميتها في منع الجفاف السريع لمادة التغطية كما تمنع تكون الحبيبات فيها.

2. مادة B.P.S وهي بديلة للـ D.P.X وتتكون من:

Dibutyl Phthalate Styrene ويختلف عن الـ D.P.X باستخدام مادة ملدنة وهي Dibutyl Phthalate بدل من Tricresyle Phosphate.

طريقة تحضير الـ D.P.X

يمزج الملدن مع الزايلين بشكل جيد ثم يذاب الدسترين وهي نفس طريقة تحضير الـ B.P.S.

مميزاتها متشابهة وهي:

أ. تجف بسرعة.

ب. معامل انكسارها قريب من معامل إنكسار الزجاج ولا تتفاعل مع الصبغة.

3. بلسم كندا Canada Balsam:

وهي مأخوذة من سيقان نبات البلسم ويتكون من 60% وزنا للصمغ الطبيعي مذابة في الزايلين حيث تذاب بالتسخين ثم يرشح قبل استعماله ويحفظ في زجاجة قاتمة لمنع تأكسد المادة ويمكن إضافة قطع صغيرة من كربونات الكالسيوم لحفظه متعادل وذلك لوجود حامض كربوكسيلي في مكوناته.

مساوئه:

1. يصبح قاتم اللون مع الزمن.
2. يتفاعل مع الصبغة مع الزمن.

وهناك مواد تغطية صمغية أخرى مثل الكلارايت ومن الجدير بـــالذكر أن استعمال مواد التغطية الصمغية يكون منذ وصول الشرائح المصبوغة للزايلـــين أي عندما لا تتأثر الصبغة أو المكونات النسيجية المصبوغة بكل من الكحول والزايلـــين وهناك طريقة أخرى لتحضير البلسم وذلك بإذابة البلســـم في الزايلـــين بنســبة 40-50% ويضاف حامض السالساليك بشكل زائد ثم يترك المحلـــول ليترســـب ويأخذ الطافي ويوضع في عبوات قائمة.

ملاحظات هامة على عملية التغطية Mounting:

1. يجب أن تكون مادة التغطية جيدة من حيث درجة اللزوجة عند الاستعمال أي في حالة السيولة وأن لا تكون لزجة بدرجة كبيرة وفي حالة كون مادة التغطيـة عالية اللزوجة يضاف إليها قليل من الزايلين وتحرك جيداً ثم تستعمل، أمـــا إذا كانت المادة قليلة اللزوجة بدرجة كبيرة فيفضل ترك الزجاجة مكشوفة لفـــترة من الزمن عدة ساعات فيتبخر جزء من المادة المذيبة وتصبح لزوجتها جيدة.
2. يجب أن تتم عملية التغطية على سطح مستو ونظيف.
3. يجب أن لا تجف المقاطع النسيجية قبل التغطية لكون مادة التغطية متجانسة مع مادة الترويق مما يزيد من سرعة انتشار المادة بين الغطاء والشريحة.
4. قبل التغطية يفضل تنظيف أطراف الشريحة والأشياء غير المرغوب فيها حـــول المقاطع بواسطة قطعة شاش مبللة بالزايلين.
5. يجب أن تكون كمية مادة التغطية متناسبة مع عدد المقاطع على الشريحة وعـدم ترك مساحات من المقاطع غير مغطاة كما يجب إزالة جميع الفقاعات الهوائيـــة المكونة بين الغطاء والشريحة في حالة تكونها.
6. في حالة استعمال مادة تغطية بطيئة الجفاف أو في حالة تغطية مقاطع سميكـة أو عينات كاملة الحشرات أو يرقات أو غيرها يجب إحاطة غطاء الشريحة بمـــادة أكثر صلابة لحماية العينات أو المقاطع من التلف باستخدام طـــلاء الأظـــافر (المناكير).

الفصل الثامن

الوسم Labelling

بعد الإنتهاء من التغطية لا بد من وسم الشرائح لتمييزها بسهولة بوضع ورقة لاصقة ويكتب عليها معلومات هامة أهمها:

1. رقم الحالة المرضية Pathology No.
2. مصدر العينة أو المقطع.
3. الصبغة المستعملة.
4. تاريخ تحضير المقاطع والشرائح.

وتكتب المعلومات بخط واضح بقلم حبر بعد أن تكون الشرائح معنونة بأرقام الحالات عند تحميل المقاطع عليها أثناء عملية القطع حيث تكتب الأرقام عندها على الشرائح بقلم حفر خاص على الزجاج يعرف بـ Diamond Pencil أي قلم ماسي وبعض الشرائح تكون مستفره أي تحتوي على طرف خشن يمكن كتابة الرقم على الشريحة بقلم رصاص أو قلم حبر صيني.

الجزء الثاني

القطع المجمد

تعريف:

القطع المجمد هي عملية تتم من خلالها الحصول على مقاطع نسيجية رقيقة قد يصل سمكها 5 ميكرون بعد طمر العينة بمادة جلاتينيه خاصة باستخدام طريقه من طرق القطع المجمد وبطريقة التجميد.

مميزات القطع المجمد:

يتميز القطع المجمد على القطع باستخدام شمع البرافين أو بالطرق الأخرى بميزات سلبية وأخرى إيجابية.

حسناتها:

1- الحصول على مقاطع نسيجية سريعة بهدف التشخيص السريع للحالة المرضية أثناء العملية الجراحية

2- إمكانية دراسة المواد الذائبة والتي قد تفقد في المعالجة النسيجية باستخدام طريقة شمع البرافين.

3- تكون درجة حرارة الانكماش قليلة للمقاطع ألمعموله بطريقة القطع المجمد مقارنة مع الطرق الأخرى.

4- تكاليف تحضير المقاطع قليلة مقارنه مع الطرق الأخرى.

سيئاتها:

1. لا يمكن حفظ العينات بهذه الطريقة لفترة طويلة إذ لا بد من وضعها في المثبت بعد القطع.
2. لا يمكن الحصول على مقاطع بسمك يقل عن 5 ميكرون مثل استخدام شمع البرافين او غيرها.

أما الميزة الرئيسية للقطع المجمد فهي تتلخص من مشاكل التثبيت التى تشمل:

- فقدان بعض المواد الذائبة في الخلية.
- استبدال لبعض مكونات الخلية.
- تغير كيماوي على المجموعات النشطة في المركبات الكيماوية للأنسجة .
- تغير في طبيعة البروتينات.
- اتلاف وتثبيط لنشاط الانزيمات .

ولذلك يفضل لدراسة تلك الأشياء اتباع طريقة القطع المجمد.

الفصل الأول

الأهداف العامة للقطع المجمد Frozen Section

يتم تحضير المقاطع النسيجية بطريقة التجميد لأهداف عديدة أهمها:

1- الحصول على تشخيص سريع للحالة المرضية أثناء العملية الجراحية بفــترة قصيرة تقل عن ساعة من الزمن وقد تصل إلى عشرين دقيقة بهدف إفــادة الجراح سواء كان لاستكمال العملية الجراحية بالاستئصال في حالة الأورام الخبيثة أو لتحديد العلاج بشكل سريع.

2- دراسة الدهون في بعض الحالات المرضية حيث يذوب الدهون في الكحول والزايلين المستخدم في مراحل المعالجة ولذلك يستخدم طريقة القطع المجمد في دراسة الدهون ومن الحالات المرضية التي تلزم لها دراسة الدهون حالــة الصمامة الدهنية في الدماغ(Fat Embolism) و التميز بين الأورام مــن نــوع Thecoma(يحــوي دهــون) والــورم الليفــي في المبيــــض (Fibroma)وأمــراض تخــزن الدهــون ودراســة ورم الدهــــون السرطاني Liposarcoma.

3- الدراسات الكيماوية للأنسجة (Histochemistry)وخاصة للعينــات غير المثبتة حيث أن عملية المعالجة و المواد المستخدمة فيها مثل الكحــول والزايلين تؤدي إلى فقدان بعض المواد الكيميائية في الأنسجة أو تغير مــن شكلها مثل الانزيمات.

4- لدراسة مكونات الجهاز العصبي وتركيب الأنسجة العصبيــة حيــث أن المقاطع المحضرة بطريقة التجميد تفيد بدرجة اكبر وتتقبل الصبغات الخاصة للأنسجة العصبية بدرجة افضل.

5- الدراسات الكيميائية المناعية للأنسجة(Immuno Histo Chemistry) وخاصة دراسة الأجسام المضادة Immunoglobulins ودراسة مستقبلات الاستروجين (Estrogen Receptor) وبالإضافة لدراسة الأورام الخبيثة بالطريقة المناعية وما يعرف بـ Tumor Markers.

6- للحصول على مقاطع من عينات من الصعب الحصول عليها بالطرق الأخرى والمعروفة مثل أنسجة الأربطة (Tendon)

مبدأ عمل القطع المجمد:

تعتمد العملية على تجميد السوائل الموجودة في العينات النسيجية (جزيئات الماء الحرة) وتحولها الى بلورات ثلجية تكسب العينات دعامة داخلية ومع وجود مادة الطمر وتجمدها (ولكونها متجانسة مع الماء) تكسب العينة دعامة خارجية وبالنتيجة تكسب العينة درجة من الصلابة تكفي للحصول على مقاطع دقيقة وتعتمد درجة الصلابة بعد التجميد على عدة عوامل أهمها:-

1-درجة الحرارة التي عليها عملية التجميد.
2-طبيعة العينة النسيجية ومكوناتها ونسبة الماء فيها.
3-نوع المادة المستخدمة في عملية الطمر.
4-سمك المقطع المأخوذ من العينة خلال المعانية .

بالإضافة إلى إعطاء الصلابة فان عملية التجميد تعتبر من وسائل التثبيت الفيزيائية حيث يمكن بهذه الطريقة حفظ العينة النسيجية فترة من الزمن (تعتمد على درجة الحرارة التي تتم عليها عملية التجميد) وبالتالي تغني هذه الطريقة عن عملية التثبيت بالإضافة لذلك فكونها تعطي صلابة تغني عن مرحلة المعالجة مما يعني اختصار مراحل التحضير بالإضافة لاختصار الوقت بدرجة كبيرة.

الفصل الثاني

طرق التجميد والأجهزة المستخدمة لذلك

كانت الطرق البدائية في التجميد المستخدمة للعينات النسيجية تعتمد على استعمال مواد كيميائية سائلة عالية التطاير ورشها على العينات مثل الايثر وايثيل كلوريد (Ethyl Chloride) وعندما تتبخر تلك المواد تبرد العينات وقد تتجمد أما الطرق الحديثة فتعتمد على استخدام وسائل وأجهزة تتلخص بثلاثة نقاط وهي:

1. استخدام جهاز القطع الجليدي (Freezing Microtome) وهو عبارة عن جهاز قطع Microtome مزود بجهاز ضخ لغاز ثاني أكسيد الكربون المضغوط وقد يكون جهاز القطع داخل حجرة مزودة باسطوانة تحتوي على غاز ثاني أكسيد الكربون المضغوط وعند تعرض العينة للغاز المضغوط تتجمد العينة وبالتالي تكتسب صلابة يمكن الحصول على مقاطع عندها ولكن تكون عملية التبريد غير دائمة وغير منتظمة وسمك المقاطع الممكنة لهذه الطريقة لا يقل عن 15ميكرون.
2. استخدام جهاز القطع منتظم البرودة (Cryostate) وهو عبارة عن جهاز قطع (Microtome)موجود داخل حجرة مبردة كهربائيا مثل الثلاجات ويكون التبريد دائم وثابت ومنتظم ويكون جهاز القطع من النوع أو الهزاز ويمكن الحصول على مقاطع بهذه الطريقة بسمك يصل إلى 5 ميكرون وتتراوح درجة حرارة القطع بين 10^0م تحت الصفر إلى 30^0م تحت الصفر.

3. استخدام جهاز القطع المجمد فوق الدقيـــق (Ultra Microtome) حيث تصل درجة الحرارة إلى 180^0م تحت الصفر ويستخدم جـــهاز قطع دقيق جدا ويمكن الحصول على مقاطع بهذه الطريقة بسمك يصل الى 0.05 ميكرون وتستخدم هـــذا الجـــهاز لأغـــراض البحـــث والدراسات الخاصة لعينات غير مثبته ومثبته بمحلول جلوترالدهايد.

4. التجميد الجاف(Dry Feezing) ولان الطريقة صبغة من الناحيـــة العمليـــة فيفضـــل اللجـــوء إلى الطريقـــة البديلـــة ومـــا يعـــرف بـــFreezing Substituteللحصول على مقاطع من عينات مثـــل العضلات Muscle B× ولأغراض الدراسات الكيميائية للأنســـجة والانزيمات يمكن تجميد العينات بطريقة التجميد الجاف وتتم كمـــا يلي:

- وضع قطعة صغيرة من العينة بقطر حوالي3-5ملـــم في محلـــول ايزونبتان Isopentane وتبريده بالنيتروجين الســـائل لدرجـــة -150^0م لمدة 18ساعة.
- نقل العينة إلى محلول الكحول الثلجي(كحول إيثلي مطلق مضاف إليه كلوريد الزئبق بنسبة 1% ووضعها في جهاز تـــبريد علـــى درجة حرارة -30^0م إلى -80^0م لعدة أيام (حوالي 5 أيام).
- تنقل العينة إلى محلول كحول ثلجي جديد وتحفظ على درجـــة حرارة 4^0م ثم تطمر من شمع درجة انصهاره قليلة أو تطمر العينـــة بمادة طمر جيلاتينيه في جهاز الكربوستات ويتم عمـــل مقـــاطع بسمك يتراوح بين 8-10ميكرون وتوضع تلـــك المقـــاطع في الأسيتون على درجة حرارة تصل إلى -70^0م لمدة 18 ساعة قبـــل الصباغة.

أهمية التجميد الجاف

تفيد عملية التجميد الجاف في:

1- دراسة الأجسام المضادة (Immunoglobulins) بطريقة التوهج Fluorescent Antibody Study.

2- دراسة المواد المتوهجة ذاتيا Auto Fluorescent Study.

3- دراسة المواد التي تتوهج نتيجة لتفاعلها مع الفورمالدهايد.

4- دراسة المواد المخاطية Mucosubstance مثل الجلايكوجين.

5- دراسة البروتينات وخاصة الانزيمات.

6- دراسة الأنسجة العضلية.

مقارنة بين طرق التجميد ودرجات الحرارة التي يتم تبريد العينات عليها

الطريقة	درجة الحرارة
1)النيتروجين السائل	-190^{0}م
2)ايزونبتان مبرد بالنيتروجين السائل	-15^{0}م
3) ثاني أكسيد الكربون الجاف (الثلج الجاف)	-70^{0}م
4)ثاني أكسيد الكربون السائل (غاز مضغوط)	-70^{0}م
5)بخاخ ايزوبروبانول	-50^{0}م
6)التجميد الكهربائي (الكريوستات)	-5^{0}م-30^{0}م

مقارنة بين نوع العينات ودرجة الحرارة المفضلة التجميد عليها

العينة	درجة الحرارة المفضلة
أ. العينات المثبتة ب. العينات غير المثبتة	-7^{0}م إلى -12^{0}م
- عينات من الدماغ والأنسجة العصبية - العقد اللمفاوية، الكلى. - الكبد، الطحال، الخصية.	-12^{0}م إلى -16^{0}م
- الثدي، الجلد والغدة الدرقية، الغدد فوق الكلوية والعضلات غدة البروستات.	-18^{0}م إلى-16^{0}م
- أنسجة العظم غير منـــزوعة الكلس	-23^{0}م - -30^{0}م

مقارنة بين طرق التجميد وأهدافها

جهاز القطع الجليدي	الكريوستات	التجميد الجاف
-دراسة الدهون	- الحالات المستعجلة	-التوهج الناتج من التفاعل مع الفورمالدهايد لبعض المواد.
-دراسة الأنسجة العصبية	- الأنزيمات	-الأنزيمات الحالة Protyolytic Enzymes
-الحالات المستعجلة	- الدهون - الأنسجة العصبية - الأجسام المضادة المتوهجة	-الأجسام المضادة المتوهجة Immuno Fluorescent Study - المواد المخاطية - وعديدة التسكر - مثل الجلايكوجين - البروتينات

ورغم وجود طرق عديدة للقطع المجمد إلا أن أفضلها وأكثرها استخداما من الناحية العملية هي طريقة استخدام الكريوستات ويمكن تسريع عملية التجميد برش المقاطع بعد طمرها بمنتجات ايزوبروباتول ثم بعد أن تبرد بدرجة متوسطة.

الفصل الثالث

مراحل تحضير المقاطع المجمده
Steps Of Frozen Section

تقتصر هذه الطريقة على القطع المجمد بغرض الحصول علـــى تشـــخيص سريع بينما سيتم التعرف لطرق الأغراض الأخرى كل في حينه.

أولا: مرحلة التثبيت:

في الحالات المستعجلة بـــهدف التشخيص السريع يتم إرسال العينة بدون مثبت (Fresh) وتكون مرفقة بنموذج خاص للقطع المجمد حيث يتم اســـتلامها بعد التأكد من الأمور التالية:

أ. التأكد من وجود العينة في الوعاء.

ب. التأكد من مطابقة المعلومات بين العينة والنموذج المرفق.

ج. التأكد أن الغرض أو الـــهدف من إرسال العينـــة القطـــع المجمـــد بـــهدف التشخيص السريع وليس بهدف آخر.

وبعد ذلك يتم تسجيل المعلومات على دفتر خاص للقطع المجمد وتعطـــى رقم خاص بالقطع المجمد فتكون جاهزة لمرحلة المعاينة.

ثانيا: مرحلة المعاينة الـ Gross:

تتم عملية المعاينة من قبل طبيب الباثولوجي المناوب حيث يتـــم وصـــف العينة بشكل موجز ثم يتم اخذ مقاطع مناسبة وممثلة للعينة بأبعاد مناسبة بحيـــث لا يتجاوز سمك المقاطع 5 ملم ولبعض العينات يتم وزن العينة قبل المرحلة اللاحقـــة واحيانا أو في حالة العينات الصغيرة توضع جميع العينة.

ثالثا: الطمر Embidding:

بعد الانتهاء من المعاينة والتي تستغرق دقائق قليلة يتم طمر العينة أو المقاطع بمادة طمر جيلاتينية خاصة للقطع المجمد وحيث أن هذه المادة متجانسة مع الماء فإنه يحدث للعينة إدماج بالإضافة إلى الطمر ومن مواد الطمر المستخدمة:

أ. الجيلاتين.

ب. Alginate Gel.

ج. الصمغ العربي.

وهناك مواد طمر بأسماء تجارية مثل O.L.T Compount و Cryoform حيث تعطي عملية الطمر بعد تجميد العينة دعامة خارجية بالإضافة للدعامة الداخلية الناتجة عن تجمد جزيئات الماء الحرة في العينة فإن ذلك يعطي العينة صلابة تمكن من الحصول على مقاطع رقيقة ويمكن تسريع عملية التجميد برش القالب ببخاخ أيزو بروماتول.

رابعا: القطع المجمد Microtomy:

لأن عملية التجميد للعينة بعد الطمر تكسب العينة درجة كبيرة من الصلابة فإن ذلك يغني عن عملية المعالجة النسيجية وبالتالي نختصر بشكل كامل بالإضافة إلى ذلك فإن عملية التجميد تكفي لحفظ العينة وبالتالي تغني عن عملية التثبيت وتحتاج العينة أو المقطع لعدة دقائق (دقيقتين إلى خمسة دقائق) حتى تجمد بشكل جيد وبعدها تكون العينة جاهزة للقطع حيث تتم عملية التجميد والقطع داخل جهاز الكريوستات (أفضل وسائل القطع المجمد) حيث يتم تقليم العينة ثم عمل المقاطع الرقيقة باستخدام المبشرة Microtome الموجود داخل الكريوستات وغالبا ما تستخدم سكاكين قطع دائمة ولوجود قطع بلاستيكية محملة على حامل مثبت على قاعدة السكين لمنع التفاف المقاطع فإن المقطع يبقى بين تلك القطع

والسكين ثم يتم تحميل المقاطع على الشرائح، وإن التصاق المقاطع على الشـــرائح يعود إلى فرق درجة الحرارة الكبير بين الشرائح (على درجة حرارة الغرفـــة) 25^{0}م تقريبا وبين درجة حرارة المقاطع حوالي −20^{0}م.

سمك المقاطع:

في حالة استخدام جهاز القطع الجليدي Freezing Microtome يمكن الحصول على مقاطع نسيجية بسمك يصل إلى 15 ميكرون كحد أدنى.

أما في حالة استخدام الكريوستات للقطع فمن الممكن الحصـــول علـــى مقاطع تصل إلى 5 ميكرون، وتستغرق عملية القطع دقائق قليلة (دقيقتين أو ثلاثة).

درجة الحرارة المناسبة للقطع باستخدام الكريوستات:

سبق ذلك بالتفصيل وبشكل مختصــــر يــتراوح درجـــة حـــرارة الكريوستات عند القطع −15^{0}م إلى −30^{0}م وبمعدل −20^{0}م.

خامسا: الصباغة Staining:

لأن عملية التجميد تكسب العينة أو المقطع تثبيت مؤقت فلا بد قبل البدء بالصباغة من تثبيت المقطع النسيجي أو تثبيت العينة النسيجية في المقطع بشكل دائم وتتم هذه العملية باستخدام الكحول الإيثيلي بتركيز 95% حيـــث أن الكحـــول يعمل على مبدأ تخثر البروتينات وكون التخثر غير رجعـــي Irreversible فـــإن عملية التثبيت هذه تكون دائمة.

الصبغة باستعمال الهيماتوكسلين والأيوسين: H&E Stain

خطوات الصبغة:

الخطوة	الوقت	الهدف
كحول إيثيلي 95%	دقيقة	التثبيت
ماء مقطر	30 غطة	إزالة بقايا الكحول وإذابة مادة الطمر
الهيماتوكسلين	دقيقة	صباغة الأنوية
الماء الجاري	10 غطات	التخلص من الصبغة الزائدة
1% كربونات الليثيوم	30 غطة	تزريق اللون
ماء مقطر	10 غطات	التخلص من بقايا كربونات الليثيوم
80% كحول إيثيلي	10 غطات	تجفيف جزئي للماء
ايوسين	30 ثانية	صبغة السيتوبلازم
كحول إيثيلي 95%	2-5 غطات	التجفيف Dehydration
كحول إيثيلي 95%	2-5 غطات	
كحول إيثيلي 100%	2-5 غطات	
كحول إيثيلي 100%	3-5 غطات	
زايلين	3-5 غطات	التنقية Clearing
زايلين	5-10 غطات	

وبعدها تتم عملية التغطية باستخدام مادة الـــ D.P.X أو غيرها من مواد التغطية الدائمة حيث تكون المقاطع جاهزة لعملية التشخيص بعدها توضع العينة في الفورمالين ليتم تحضير المقاطع بطريقة شمع البرافين.

الفصل الرابع

ملاحظات عامة على عملية القطع المجمد:

ملاحظة رقم (1):

يتم تحضر المقاطع بطريقة التجميد أحيانا ولبعض الأهداف مـــن عينـــات مثبتة حيث توجد عدة محاليل تثبيت وتحضر بعدة طرق منها:

أ. استخدام محلول الفورمالين الملحي 10% Formalsaline.

ب. استخدام محلول بوين Boiun's وفي هذه الحالة يجب غسل العينـــات قبل تجميدها.

ج. يمكن غلي العينة لعدة دقائق في فورمالين 10% وبعدها تغسل بالماء ثم تجمد.

د. توضع العينات في فورمالين مركز وبعدها توضع في حمام مائي علـــى درجة حرارة 50 – 60^{0}م لمدة دقيقتين مع التحريك للعينات خـــلال التسخين.

هـ. استخدام محلول الفورمالين الكلسي 10% ويحضر كالتالي:

فورمالين مركز	100 مل
ماء مقطر	900 مل
كلوريد الكالسيوم 10%	100 مل

وتتم عملية التجميد على درجة حرارة 4^{0}م وهذه الطريقة هـــي أكـــثر الطرق استخداما من الناحية العملية للتثبيت في حالة القطع المجمد وخاصة لأغراض الدراسات الكيميائية في الأنسجة ودراسة الدهون.

واستخدام عينات مثبتة للقطع المجمد يسبب مشاكل كثيرة منها:

1. تظهر أشياء في المقاطع المثبتة لم تكن موجودة أصلا في العينات تعـــرف بــــ (Artifacts).
2. زيادة كثافة العينات النسيجية نتيجة زيادة كمية الماء فيها والمثبت مما يسبب في تكون بلورات ثلجية تعيق عملية القطع.

ملاحظة رقم (2):

في حالة احتواء محلول التثبيت على كلوريد الزئبق يجب معالجة العينات بمحلول اليود قبل القطع لأنه في حالة وجودها في العينة خلال التجميد تتكون بلورات قاسية تؤدي إلى تثلم السكين بدرجة كبيرة.

ملاحظة رقم (3):

يجب أن لا تحتوي محاليل التثبيت المستخدمة للقطع المجمد على الكحول أو أملاح الكروم لأنها تجعل الأنسجة هشة صعبة القطع بالإضافة لذلك فإن وجود الكحول يغير من درجة تجمد العينة.

ملاحظة رقم (4):

في حالة عمل مقاطع مجمدة في عينات غير مثبتة يفضل أن تكون درجة حرارة الكريوستات حوالي -20^0م أما في حالة قطع عينات مثبتة فإن درجة الحرارة المفضلة للقطع هي حوالي -10^0م وذلك نتيجة زيادة كمية الماء في العينة من المثبت.

ملاحظة رقم (5):

لعمل مقاطع بطريقة التجميد بهدف الدراسات الكيميائية على الأنسجة Histochemistry يفضل مسح الشريحة أو تغطيتها بمحلول جيلاتين فورمالدهايد لمنع سقوط المقاطع خلال الصباغة ويحضر المحلول كالتالي:

1% جيلاتين	5سم^3	(يحضر بماء ساخن)
2% فورمالين	5سم^3	

وبعد تغطية الشرائح بالمحلول تترك الشرائح لتجف على درجة حرارة 37^0م لمدة ساعة أو على مدار الليل قبل وضع المقاطع عليها.

ملاحظة رقم (6):

بالنسبة لعملية الطمر بالإضافة إلى المواد الجيلاتينية الجاهزة المستخدمة لذلك هناك عدة طرق لتحضير هذه المواد منها:

أ. **الطريقة الأولى: يتكون الجيلاتين من:**

جيلاتين	16 غم
جليسرين	15 مل
ماء مقطر	70 مل
ثايمول	مدة قطع صغيرة

يذاب الجيلاتين بالماء المقطر الساخن ثم يضاف إليه الجليسرين بعد أن يبرد ثم يضاف عدة قطع من الثايمول ويحفظ المحلول على درجة 4^{0}م ويسخن عند الاستعمال في حمام مائي حتى يصبح سائلا.

طريقة العمل:

1) تثبت العينات في الفورمالين الكلسي 10%.
2) تغسل بالماء الجاري على مدار الليل.
3) تغمر العينات في محلول الطمر لمدة 6 ساعات على درجة حرارة 37^{0}م.
4) تطمر العينات في محلول طمر جديد ثم تبرد في الثلاجة.
5) تحفظ القوالب في الفورمالين الكلسي لوقت الاستعمال فتكتسب صلابة أكثر.

ب. **الطريقة الثانية:**

يذاب الجيلاتين (25غم) في 75سم3 من الفينول بتركيز 1% (1غم فينول في 100 مل ماء مقطر) على درجة حرارة 37^{0}م فيكون تركيزه 25% أما لتحضير الجيلاتين بتركيز 12.5% يخفف حجم معين من المحلول السابق بكمية مكافئة من الفينول تركيزه 1%.

خطوات العمل:

1) بالنسبة للعينات المثبتة تغسل على مدار الليل بالماء الجاري.
2) غمر العينة بالجيلاتين تركيز 12.5% على درجة حرارة 37^0م لمدة 24 ساعة.
3) غمر العينة بالجيلاتين تركيز 25% على درجة حرارة 37^0م لمدة 24 ساعة أيضا.
4) طمر العينة في الجيلاتين تركيز 25% (وجيلاتين جديد) على درجة حرارة الغرفة.
5) تبريد القالب على حرارة 4^0م (في الثلاجة).
6) تقليم حواف القاب ووضعه في الفورمالين الكلسي 10% حيث يحفظ لحين الاستعمال وهناك مواد طمر أخرى غير الجيلاتين منها:

1. **الآجار**: يستعمل الآجار للطمر للعينات المثبتة وغير المثبتة حيث يمكن طمر العينة بمحلول آجار محضر بفورمالين ملطف Buffered ولا ينصبغ الآجار بأي من الهيماتوكسلين أو الأيوسين.
2. الطمر باستعمال الصمغ العربي Arabic Gum حيث توضع العينة في محلول الصمغ وتحرك لفترة من الزمن ثم يجمد ويجب غسل المقاطع بالماء قبل الصباغة.

المكونات:

صمغ عربي	2 غم
سكروز	60 غم
ماء مقطر	200 مل يحضر ويحفظ على درجة حرارة 4^0م.

طريقة العمل:

1. تثبت العينات في محلول فورمالين كلسي 10% على درجة حرارة 4^0م لمدة 18 ساعة.

2. غسل الشرائح بالماء الجاري.

3. تجفيف العينات بورق الترشيح.

4. وضع العينات في محلول الصمغ لمدة 18 ساعة على درجة حرارة 4^0م.

5. تجفيف العينات بورق التنشيف بعد الترشيح.

6. تجميد العينات بإحدى طرق التجميد المعروفة وأفضلها استخدام الكريوستات.

ملاحظة رقم (6):

هناك طرق أخرى مختلفة لتحضير العينات للقطع المجمد منها:

1. طريقة فريدلاند باستعمال الآجار

الخطوات:

أ. يتم غلي العينة في فورمالين تركيز 10%.

ب. استبدال الفورمالين بمحلول آجار 2% معقم (مسخن مسبقا). ثم يتم غلي المحلول مع العينات لمدة دقيقة.

ج. التخلص من الآجار وتجميد العينة مباشرة ويمكن ترك الآجار جاهزا في أنابيب ويصهر بالتسخين مباشرة قبل الإستعمال.

2. طريقة ليف وتوماس:

يتم تثبيت العينة بالفورمالين على درجة حرارة 80^0م حيث تعطى نتيجة جيدة ثم يتم استبدال الفورمالين بالمحلول التالي:

فورمالين 10 مل

حامض الخليك الثلجي 1مل

إيثانول 95% 80 مل

ثم يتم غلي العينة مع المحلول لمدة دقيقة وبعد أن تبرد يتم غسل العينة من الكحول ثم تقطع إلى مقاطع بسمك 1-4 ملم ثم تجمد.

3. طريقة بيرز Pearse:

الخطوات:

أ. تثبت العينة في فورمالين 15% على درجة 4^0م لمدة 10 – 16 ساعة.

ب. تغسل العينة بالماء الجاري لمدة نصف ساعة.

ج. طمر العينة في الجيلاتين على درجة 37^0م لمدة ساعة ويحضر كالتالي.

جيلاتين 15 غم

جليسرين 15 مل

ماء مقطر 70 مل

يضاف بضع بلورات من الثايمول للحفظ ويجب أن يكون الماء مسخن.

د. يبرد ويوضع في فورمالين 40% على درجة 17-22^0م لمدة ساعة وبعدها تغسل بالماء.

هـ. تحفظ العينات على درجة 4^0م لوقت القطع.

ملاحظة رقم (7):

بالنسبة للأنسجة العصبية أفضل محاليل التثبيت هو
Formal Amonium Bromid

ملاحظة رقم (8):

هناك طريقة أخرى لصباغة المقاطع المجمد في الحالات المستعجلة غير صبغة H&E وهي صبغة الثيوتين أو التولودين الأزرق أو المثيلين الأزرق وخطوات الصبغة كالتالي:

1. تثبيت المقاطع في كحول إيثيلى 95% ثم غسلها بالماء 30 غطة.
2. صباغة المقاطع بإحدى محاليل الصبغة المذكورة وتحضر الصبغة كالتالي:
ثيوتين 1%، تولودين 0.5% مثلين 0.5% والمذيب هو كحول إيثلي20%.
3. غسل الشرائح بالماء ثم تغطيتها بمادة تغطية مائية مثل جليسرين جلي.

ملاحظة رقم (9):

بالإضافة للمقاطع المجمدة غالبا ما يأخذ مسحة (Smears) من العينة وهي غـــير مثبتة بعد عمل مقطع فيها وخاص عينات العقد الليمفاوية وتعرف هذه الطريقـــة Impression Film أو Touch Preperation حيـــث تكـــون بضغـــط و وجنة الشريحة وهي حافة على حافة القطع للعينة فتلتصق بعض الخلايا من العينـــة على الشريحة وبعد أن تجف الشرائح تعامل معاملة العينات الخلوية أو معامل المقاطع المجمدة في الصباغة وقد تعطي نتيجة جيدة وأحيانا أفضل من المقاطع نفسها.

الجزء الثالث

الدراسات الخلوية Cytology

التعريف:

الـــ Cytology هــو دراســة الخلايــا التقشــرية بالأنســـجة (The Study ofExofoliativeCells) حيث تتعرض الخلايـــا في الأنســـجة وخاصة الأنسجة الطلائية وبعض الأنسجة الضامة مثل: نسيج الدم للأنسلاخ وقـد يكون تقشر الخلايا وإنسلاخها كلياً أو جزئياً من النسيج فيضعف ارتباط الخلايـــا السطحية.

الطريقة:

أولاً: تقشر ميكانيكي حيث يتم سلخ الخلايا السطحية عن الأنسجة بأداة معينة مثل ضاغطة اللسان Tongue Depressor أو بفرشاة كما هو الحـــال في العينات التي تأخذ بالتنظير.

ثانياً: تقشر تلقائي أو ذاتي حيث يضعف الإرتباط بين الخلايا والأنسجة لدرجـة تنسلخ معها الخلايا كلياً عن النسيج أما بالنسبة لخلايا الدم فتقشرها يعـــني خروجها من مجرى الدم.

سبب حدوث التقشر:

تنسلخ الخلايا أو تتقشر عن النسيج في حالة من إثنتين:

أولاً: تقشر طبيعي: بفعل عملية التجدد التلقائي حيث أن الخلايا عندما تهـــرم يضعف الإرتباط لدرجة تنلسخ من النسيج.

ثانياً: تقشر بفعل العوامل المرضية: تقشر غير طبيعي.

الهدف من الدراسات الخلوية Cytology:

تهدف دراسة العينات الخلوية إلى الحصول على تشخيص مبكر للحالات المرضية وخاصة حالات السرطان بالإضافة إلى التعرف على تأثير الغدد الصماء وفعاليتها أي تأثير الهرومات التي تفرزها الغدد على الأنسجة الأخرى كما ويمكن التعرف على رد فعل الأنسجة في الدفاع عن الجسم في معظم الأمراض كما تفيد الدراسات الخلوية في دراسة بعض الأمراض الطفيلية والجرثومية.

مراحل تحضير العينات الخلوية Cytology:

أولا: الحصول على العينة حيث يتم أخذ العينات الخلوية بطرق متعددة نذكر منها:

أ. مسحات مباشرة:

من بطانة فتحات وتجاويف الجسم السطحية ومنها:

1) مسحة من بطانة الفم من الداخل Buccal Smear وهذه تفيد في دراسة أجسام بار الخاصة لتحديد جنس الأنسان ذكر أو أنثى في بعض الحالات المرضية حيث يتم أخذ عينة بواسطة شريحة نظيفة أو بواسطة ضاغطة اللسان ثم تفرد العينة مباشرة على شرائح نظيفة.

2) مسحات من بطانة الأنف (Nasal Smear) حيث يتم الحصول على العينة بواسطة ما يسمى بـ (Cotton Swab) ثم تفرد العينة على شرائح نظيفة وتفيد هذه العينات في حالات الحساسية المفرطة.

3) مسحات من المهبل وعنق الرحم حيث توجد لهذه العينات في بعض المستشفيات شرائح خاصة تكون الشريحة مقسمة عرضيا إلى ثلاثة أجزاء: الجزء الأول مكتوب عليه حرف V من -Vaginal- أي من المهبل والجزء

الأوسط عليه حرف C من Cervical- والطرف الأخير عليه حرف E مـــن -Endocervical-وغالباً تستعمل شرائح عادية لعدم توفر هـــذه الشـــرائح الخاصة وتعرف هذه العينات بإسم Pap Smear وتأخذ العينات مـــن قبـــل طبيب نسائية بواسطة أدوات خاصة.

4) مسحة من جفن العين من الداخل تعـــرف بـــ Conjunctival Smear وتأخذ بواسطة الـ Cotton Swab.

5) مسحات من الأجزاء الخارجية من الجسم (الجلد) في حالة وجود تقرحـــات ظاهرة يمكن عمل مسحة

ب. عينات تأخذ بالفرشاة:

خلال عملية التنظير مثل تنظير المعدة أو تنظير القصبات الهوائية والشـــعب الرئوية حيث تأخذ العينات بواسطة فرشاة خاصة من النايلون ثم يتم عمل مسحات مباشرة مع الشرائح وتغسل بعد ذلك الفرشاة في محلول ملحي (Saline) حيـــث تعرف العينة بـــ .Gastric orBronchial Brushand wash

جـ عينات تعطى من قبل المريض مباشرة:

وتشمل عينات البول (Urine) وعينات البلغم (Sputum) حيث يجـــب أن تكون عينة البول مأخوذة خلال النهار وليست العينة الصباحيـــة وذلـــك لأن الخلايا غالباً في العينة الصباحية تكون متحللة جزئيا ولا تفيد لأغراض التشـــخيص أما عينة البلغم فيجب أن تأخذ بالقشع من القصبة الهوائية وليست من اللعاب.

وتفيد عينات البلغم في تشخيص الخلايا السرطانية في القصبـــة الهوائيـــة والشعيبات الرئوية كما تفيد في تشخيص بعض الأمراض الجرثوميـــة بالإضافـــة للكشف عن وجود دقائق أو بلورات من الأسبست وفي حالة وجود أكثر من عينة للمريض الواحد في نفس اليوم يجب مزجها لعمل شرائح منها وفي حالـــة عمـــل

المسحات يجب إختيار المناطق البيضاء أو الحمراء من العينة حيث أن المناطق البيضاء قد تحتوي على خلايا سرطانية أما المناطق الحمراء فتحتوي على خلايا دم حمـــــراء حيث أن وجود دم مع المخاط قد يكون دليل على وجود خلايا سرطانية أمـــا في حالة عدم وجود مناطق ملونة فيجب عمل عدة مسحات من مناطق مختلفة.

ملاحظة عامة على عينات البلغم Sputum

1. يجب أن تكون العينة صباحية قبل الافطار لتلافي وجود سائل لعابي وبقايـا طعام في العينة.
2. يجب تكرار دراسة عينات صباحية لثلاثة أيام متتالية وخاصة إذا أعطــت أحدى العينات نتيجة إيجابية لوجود خلايا سرطانية.
3. يجب عدم إعطاء عينات البلغم للدراسة خلال أسبوعين بعد إجراء عمليـة تنظير للقصبات الهوائية وذلك بسبب وجود خلايا التهابية كثـــيرة مــن العينات خلال تلك الفترة بسبب التنظير.

أما عينات البول فتفيد في تشخيص أمراض المثانة والمجاري البولية بالإضافة لأمراض الكلى وخاصة الأورام السرطانية خصوصا لمن يعمل في مجال الصناعـــات المطاطية والبلاستيكية حيث أنه من الضروري تحضير العينات على شرائح خــلال فترة لا تتجاوز ساعتين بعد أخذ العينة حتى لا تتحلل الخلايا.

د. عينات سائلة من تجاويف الجسم:

1) عينات سائل الدماغي الشوكي (Cerebrospinal Fluid) [CSF] وتأخذ بالوخز بإبرة خاصة في المنطقة القطنية تسمى العملية (Lumbar Puncture) وغالبا ما تكون العينة على شكل سائل رائق.

2) عينات تؤخذ من التجويف الصدري (البلوري) (Pleural Fluid) وغالبـا تؤخذ إما بواسطة إبرة عن طريق السحب أو بطريقة التجميع.

3) عينات من التجويف البطني (Peritoneal Fluid) وتؤخذ بنفس الطرق السابقة.

4) عينات سائل الجنب (Ascitic Fluid) وتؤخذ بنفس الطرق السابقة.

5) عينات من تجاويف أخرى مثل عينات من تجاويف المفاصل (Synovial Fluid) وعينات من حويصلات أو أكياس من المبايض (Ovarian Cyst) بالنسبة لعينات التجاويف غالباً تكون بكميات كبيرة بإستثناء الـ CSF وغالباً ما تحتوي على كتل خلوية أو أجزاء متخثرة وفي هذه الحالة يجب تجميع تلك الكتل الخلوية أو الكتل المتخثرة مع بعضها لعمل ما يعرف بالقالب الخلوي Cell Block تعامل معاملة العينات النسيجية.

هـ عينات تؤخذ بالسحب بإبرة من أعضاء مختلفة سطحية أو عميقة تعرف بـ Fine Needle Aspiration (FNA):

1. الأجزاء أو الأعضاء السطحية وتشمل:

** **العقد الليمفاوية** **: حيث أنه في حالة وجود عقد ليمفاوية في منطقة الرقبة أو تحت الإبط أو في أي مكان آخر في الجسم يمكن لمسها أو حسها بواسطة أصابع اليد مباشرة وتثبت العقد الليمفاوية بين أصابع اليد وتغرس الإبرة بين الأصابع داخل العقدة الليمفاوية ويسحب منها عينة، وغالباً ما تكون هذه العينة ذات قوام سميك ولذلك يجب عمل عدة مسحات على عدة شرائح مباشرة من العينة.

** **الغدة الدرقية** **: حيث من الممكن بواسطة التصوير الشعاعي الكشف عن وجود أي وضع غير طبيعي في الغدة الدرقية وفي حالة وجوده تؤخذ عينة بواسطة الإبرة يتم فرد جزء من العينة على عدة شرائح وبقية العينة توضع في وعاء خاص وتغسل الإبرة بواسطة المحلول الملحي (Saline) وتفرغ في الوعاء.

** **عينات من الثدي** **: وتشمل جزئين: عينات تؤخذ بواسطة إبرة بعـــد عمل صور شعاعية للثدي وتصوير الثدي بواسطة جـــهاز Mammogram وفي حالة وجود كتل صلبة أو حويصلات في الثدي يتم تحديد موضعها بالدقة بواسـطة جهاز الأمواج فوق الصوتية (Ultra Sound) وأحيانا عند عصر الحلمة يخـــرج سائل لزج يعرف بــ (Nipple Discharge). تحضر منه مسحات عدة علـــى شرائح:

2. **الأجزاء أو الأعضاء العميقة مثل**: الرئتين، الكبد، المبايض أو في حالة وجــود كتل أو أورام في أي عضو أو جزء داخلي في الجسم يجب تحديد موقع الكتلــة بدقة بواسطة جهاز الأمواج فوق الصوتية (Ultrasound) أو جهاز التصويــر الطبقي المحوري CT Scaning ويتم تصويرها مرة أخرى لمعرفـــة مـــا إذا كانت الإبرة قد دخلت في وسط الكتلة أم لا ثم يعاد المحاولة عدة مرات حـــتى يتم التأكد من وجود الإبرة في وسط الكتلة بعدها يتم سحب عينة بواســـطة الإبرة ثم تسحب وتفرد العينة على عدة شرائح وفي حالة وجود سائل أكـــثر توضع في وعاء خاص ثم تغسل الإبرة بواسطة المحلول الملحي Saline وتفــرغ مع هذه المحلول في وعاء آخر.

نستنتج مما سبق أن العينات التي تؤخذ بهذه الطريقة F.N.A

تقسم إلى قسمين:

القسم الأول: وتشمل مسحات على شرائح.

القسم الثاني: عينات سائلة في أوعية خاصة.

ملاحظة:

غالبا ما يحتاج الطبيب الذي يأخذ العينة للتأكد من أن العينة التي أخـــذت تكفي للتشخيص أم لا أو حتى يمكن الحصول على تشخيص سريع لذلك وجـــدت

صبغة خاصة سريع لهذه الحالة تعرف بـ Diff. Quick Stain حيث تصبغ بعض الشرائح التي عملت بطريقة مسحات مباشرة على شرائح وتجفف وتصبغ خلال فترة زمنية قصيرة قد تصل إلى دقيقتين ويتم تشخيصها مباشرة بواسطة المجهر وفي حالة أن تكون الشرائح كافية للتشخيص يكتفي بالعينة المأخوذة، أما في حالة عدم وجود خلايا واضحة أو في حالة عدم كفاية العينة للتشخيص فتعاد المحاولة مرة أخرى حتى تعطي نتيجة وسيرد تفاصيل هذه الصبغة في موضوع الصباغة.

ثانياً: استلام العينة:

تكون العينات الخلوية في جميع الحالات على شكل أو أكثر من الأشكال التالية:

أ. مسحات على شرائح.

ب. مسحات على ما يعرف بـ Cotton Swab.

ج. سائل رائق.

د. سائل لزج.

ولأن معظم العينات الخلوية ترسل بشكل غير مثبت لذلك يجب التعامل معها بحذر في البداية ولبس كفوف خاصة تعرف بـ Examination gloves عند تحضيرها واستلامها بالإضافة إلا أنه من الضروري تحضيرها بأسرع ما يمكن حتى يقلل قدر الإمكان من تلف الخلايا وفي حالة تعذر ذلك بحفظ العينة في الثلاجة على درجة 4^0م أو يخلط بالكحول الإيثيلي تركيزه 50% بنسبة 1:1.

وحتى يتم استلام العينة بطريقة صحيحة يجب مراعاة ما يلي:

1. التأكد من وجود العينة.
2. مطابقة المعلومات الموجودة على العينة مع المعلومات الموجودة على النموذج المرفق -Request Form- وخاصة الإسم ونوع العينة.

3. التأكد من الفحص المطلوب أن تكون العينة مرسلة لقسمة الدراسات الخلوية Cytology.

4. وجود معلومات أولية عن الحالة المرضية على النموذج تعرف بـــــــ -Clinical Data- .

ثالثا: تحضير العينات:

قبل تحضير العينة على شرائح تعطى رقـــم متسلســل Cytology No. بحيث يكتب الرقم على الشريحة ثم على العينة ثم على النموذج المرفـــق وبعدهـــا يسجل على الدفتر الخاص لعينات الـــ Cytology.

تجهيز العينة على الشرائح تعتمد على طبيعة العينة:

1. بالنسبة للعينات التي تكون مسحة على الشرائح لا تحتاج إلى تحضير.
2. بالنسبة للعينات التي تكون مسحة على Cotton Swab يتم عمل مسحة مباشرة على شرائح بعد إعطائها الرقم المتسلسل شرط أن لا تكون العينـــة في أنبوبة الزراعة لأنه في هذه الحالة لا تفيد في الدراسات الخلوية وذلـــك لتفسخ الخلايا.
3. في حالة كون العينة سائل لزج Viscous fluid مثل عينات البلغم فيتـــم عمل مسحات من العينة من مناطق مختلفة على شرائح بواســـطة عـــود خشب (Wooden Stick) بحيث تكون المسحات رقيقة.
4. في حالة كون العينة سائل رائق تعتمد الطريقة على حجم السائل بالنســـبة لعينات التجويف الصدري أو التجويف البطني غالبا ما تحتوي العينة علـــى كتل نسيجية أو كتل متخـــثرة حيـــث يتـــم عمـــل قـــالب خلـــوي -Cell Block- منها ويتم معاملة ذلك معاملة العينات النسيجية بعدهـــا يتم تحضير العينة على شرائح مثل بقية عينات الســـائل الرائـــق وذلـــك

باستخدام جهاز الترسيب الخاص بالعينات الخلوية (Cytospin) حيث توضع كمية من العينة في الحجرة الخاصة (Chamber) توضع على حامل (Holder) وقبل ذلك توضع الشريحة بعد ترقيمها مع ورقة الترشيح الخاصة (Filter Card) بحيث تكون الثقوب على نفس المستوى بعد وضعها في الجهاز وبشكل متوازن يتم ترسيب الخلايا من العينة على الشرائح بسرعة = 1500 دورة في الدقيقة لمدة عشر دقائق بعد الإنتهاء من تحضير العينات على شرائح إذا كان الترسيب سميكاً يجب فرده على الشريحة قبل أن تجف بواسطة عود الخشب Stick.

رابعاً: التثبيت:

معظم العينات الخلوية تكون غنية بالمواد المخاطية مما يساعد في التصاق الخلايا بالشريحة بعد تحضير العينات تقسم الشرائح إلى قسمين حسب الصبغة:

أ. الشرائح المراد صباغتها بـ Diff Quick Stain أو بصباغة رايت Wright Stain أو صبغة Giemsa، تترك هذه الشرائح لتجف بالهواء لعدة دقائق قبل البدء بالصبغة.

ب. الشرائح المراد صباغتها بالصبغات الأخرى توضع في المثبت مباشرة.

محاليل التثبيت الخاص بالعينات الخلوية:

1. كحول إيثيلي (إيثانول) Ethanol بتركيز 95% وهو المثبت الأفضل للعينات الخلوية ويعمل على مبدأ تخثر البروتينات لفترة عشرة دقائق على الأقل.
2. كحول إيثيلي 95% مضاف إليه حامض الخليك الثلجي بنسبة 3% حيث يعطى هذا المثبت ميزات جيدة للنواة والسيتوبلازم وذلك لأنه يثبت بروتينات النواة أيضا.

*** في حالة وجود كمية كبيرة من الدم في العينات الخلوية أو في المسحات المعمولة على الشرائح يفضل التخلص من خلايا الدم قبل عملية التثبيت وذلك لجميع العينات وخاصة عينات الـ (F.N.A) بإستثناء عينات البول وسائل النخاع الشوكي الدماغي (CSF) وعينات البلغم حيث أن وجود الدم يفيد في عملية التشخيص.

كيفية التخلص من خلايا الدم في الشرائح:

أ. بعد أن تجف الشرائح توضع في محلول ملحي متعادل Saline لمدة عشرون ثانية لإستعادة الخلايا لحجمها الأصلي.

ب. توضع الشرائح في محلول كارنوي يتكون من (90مل إيثانول 95% مضاف إليه 10 مل حامض الخليك الثلجي) لمدة دقيقتين وذلك يسبب تحلل خلايا الدم.

ج. تغسل الشرائح بالماء المقطر لمدة عشرة ثواني.

د. توضع الشرائح في الكحول الإيثيلي للتثبيت.

بعد تثبيت الشرائح في الكحول الإيثيلي لمدة عشرة دقائق على الأقل تبدأ عملية الصباغة وفي حالة ترك الشرائح لفترة طويلة لا تتأثر الخلايا بذلك فيجب تغيير الكحول الإيثيلي يوميا أو يوم بعد يوم على الأكثر لتقليل إحتمال حصول تلوث بين العينات.

خامسا: الصباغة:

هناك ثلاثة صبغات للعينات الخلوية وهي:

أ. صبغة الهيماتوكسلين والأيوسين H&E Stain.

ب. صبغة بابنكيولاي Papanicolaou Stain.

ج. الصبغة السريعة Diff Quik Stain.

أ. الصبغة السريعة Diff Quick Stain:

تستعمل هذه الصبغة للحصول على تشخيص سريع خلال أخذ العينة الخلوية بطريقة Fine Needle Aspiration (F.N.A) أو على الأقل لمعرفة ما إذا كانت العينة المأخوذة تكفي للتشخيص Adequate أم لا.

مكونات الصبغة:

1. كحول مثيلي Diff.3 Fixative Methanol، ويستخدم كمثبت على مبدأ تخثر البروتينات و تترك الشرائح فيه لمدة 10 ثواني.
2. محلول الأيوسين المنظم Diff.3 Solution A، يصبغ المكونات الخلوية القاعدية (المحبة للصبغة الحامضية) و تترك الشرائح فيه لمدة 10 ثواني.
3. محلول أزرق المثلين المتعدد الألوان المنظم.
Diff.3 Solution B: Buffered poly chromic Methylene Blue.
لمدة 10 ثواني.
4. تغسل الشرائح مباشرة في محلول الغسيل المنظم **Diff.3 Buffered Solution**.
5. تترك الشرائح دقائق بسيطة لتجف تفحص تحت المجهر.

ب. صبغة الهيماتوكسلين والأيوسين H&E Stain:

بالنسبة لتحضير محاليل الصبغة فقد ورد ذكره بالتفصيل في موضوع الصبغة المتعلقة بمقاطع شمع البرافين.

الخطوة	الوقت	الهدف
1. 95% إيثانول	20 غطة (Dip)	إعادة التميه
2. 95% إيثانول	20 غطة	الإماهة
3. ماء مقطر	20 غطة	Rehydration
4. هيماتوكسلين (نوع ماير)	15 دقيقة	صباغة الأنوية
5. ماء جاري	20 غطة	غسيل
6. 1% كربونات الليثيوم	20 غطة	(Blueing) التزريق (إعطاء اللون الأزرق
7. ماء مقطر	20 غطة	غسيل
8. أيوسين	5 دقائق	صباغة السيتوبلازم
9. إيثانول 80%	5 –10 غطات	تجفيف جزئي
10. إيثانول 95%	5–10 غطات	
11. إيثانول 95%	5–10 غطات	التجفيف (إزالة الماء)
12. إيثانول مطلق 100%	5–10 غطات	
13. إيثانول مطلق 100%	5–10 غطات	(Dehydration)
14. زايلين	10–20 غطة	الترويق
15. زايلين	10–20 غطة	Clearing

النتيجة:

الأنوية: أزرق/ السيتوبلازم: زهري خلايا الدم الحمراء حبيبات الخلايا الحامضية تظهر بلون أحمر لامع.

هـ صبغة بابنكولاي Pap Stain:

تتميز هذه الصبغة عن الصبغة السابقه (H&E) بأنها صبغة

تمايز:

Diffrential Stain حيث يعتمد لون السيتوبلازم في الخلايا على درجة نشاط الخلية.

محاليل الصبغة:

(1) محلول أو صبغة برتقالي جـ Orange G

تحضيره:

المحلول المركز **Stock Solution**: يذاب 11.2 غم من الصبغة الجافة في 100 مل ماء مقطر مسخن إلى درجة حرارة 70^0–80^0م.

المحلول العملي: Working Solution:

* محلول صبغة مركز (10%)	20 مل.
* حامض الفسفوتنجستك (Phosphotungstic Acid)	0.15 غم
* 95% إيثانول	970 $سم^3$
* حامض الخليك الثلجي (إختياري)	10 $سم^3$

بعد تحضير الصبغة يجب ترشيحها قبل الإستعمال.

(2) محلول أو صبغة الأيوسين آزار Eosin Azar

وهي صبغة متعددة الألوان تتكون من:

أ. **الأخضر الخفيف Light Green**: وهو صبغة حامضية يصبغ السيتوبلازم للخلايا الأكثر نشاطا حيث يرتبط مع البروتينات القاعدية.

ب. **أيوسين ي**: يصبغ السيتوبلازم للخلايا السطحية (الأقل نشاطا).

تحضير الصبغة: الصبغة المركزة (Stock Solution):

أ. أخضر خفيف Light Green تركيز 3%، يذاب 5 غم من الصبغة في 100 مل ماء مقطر مسخن إلى 70-80 ^{0}م بعدها يضاف 0.3 غم من أخضر السريع Fast Green إلى المحلول السابق وهو لا يزال ساخن مما يزيد من قوة الصبغة الخضراء.

- بعد تحضير الصبغة المركزة تبرد وتحفظ في وعاء بني داكن.

ب. صبغة الأيوسين 20% يذاب 25 غم أيوسين ي (Eosin Y) في 100 مل ماء مقطر مسخن إلى 70 ^{0}م – 80 ^{0}م.

- يترك المحلول حتى يبرد ثم يحفظ في وعاء بني داكن المحلول العملي لصبغة أيوسين آزار Working Solution EA يتكون المحلول العملي مما يلي:

95% إيثانول	700 مل
ميثانول مطلق	250 مل
حامض الخليك الثلجي	20 مل
أخضر خفيف مركز	10 مل
أيوسين مركز	20 مل
حامض الفوسفوتنجستك	4 غم

الطريقة (PAP Stain):

الوسط	الوقت	الهدف
1. إيثانول 95%	20 غطة (Dip)	إعادة الإماهة
2. إيثانول 95%	20 غطة	Rehydration
3. ماء مقطر	20 غطة	
4. هيماتوكسلين (نوع ماير)	15 دقيقة	صباغة الأنوية
5. ماء جاري	20 دقيقة	غسيل
6. 1% كربونات الليثيوم	20 غطة	تزريق Blueing
7. ماء مقطر	20 غطة	غسيل
8. 80% إيثانول	20 غطة	تجفيف جزئي
9. صبغة برتقالي G	5 دقائق	صباغة السيتوبلازم
10. إيثانول 95%	5 غطات	تمايز
11. إيثانول 95%	5 غطات	Differentiation
12. صبغة عملية أيوسين آزار	5 دقائق	صباغة السيتوبلازم
13. إيثانول 95%	5 غطات	تمايز
14. إيثانول 95%	5 غطات	
15. إيثانول 100%	10 غطات	تجفيف
16. إيثانول 100%	10 غطات	Dehydration
17. زايلين	20 غطة	ترويق
18. زايلين	20 غطة	Clearing

- بعد انتهاء الصباغة تغطي الشرائح باستعمال وسط التغطية (**D.P.X**).

النتيجة: الأنوية: لون أزرق.

السيتوبلازم للخلايا السطحية (الأقل نشاطا) لون برتقالي.

السيتوبلازم للخلايا الأكثر نشاطا وهي:

• الخلايا المتوسطة Intermediate	لون أخضر
• الخلايا فوق القاعدة (Parabasal Cells)	
• الخلايا العمادية (Columnar Cells)	
• الخلايا الوحيدة (في الأنسجة Histiocytes	
• الخلايا البيضاء Leukocytes	
• الخلايا الأقل نضوجا Immature Cells	
• الخلايا السرطانية Malignant Cells	

ملاحظات عملية عامة:

1. عند نقل شرائح العينات الخلوية -Cytology - من المـــاء المقطـــر إلى الهيماتوكسلين يجب غط الشرائح عدة مرات (حـــوالي 10 مـــرات) في الهيماتوكسلين قبل تركها في الصبغة.
2. عند استخدام محلول كربونات الليثيوم في عملية التزريق يجـــب غســـل الشرائح جيدا بالماء الجاري قبل متابعة الصبغة.
3. يجب ان تكون الغطات -Dipping-بنعومة وخفة حتى لا يـــؤدي إلى سقوط الخلايا عن الشرائح.
4. يجب أن لا يقل عدد الغطات عن عشرة حتى يتم إحلال المحلول الجديد أو الصبغة محل المحلول السابق.
5. يجب عدم ترك الشرائح في الكحول الإيثيلي بتركيز 95% بعـــد صبغـــة برتقـــالي جـــ (Orange G) أو بعـــد صبغـــة الأيوســـــين آزار (Eosin Azar) أكثر من 10 غطات.

6. يجب تغيير الإيثانول في عملية التثبيت وفي الصباغة يوميا أو يوم بعد يـــوم على الأكثر.
7. يجب التخلص من المحلول أو الصبغة كليا قبل الإنتقال إلى الخطوة اللاحقـة بإمالة حامل الشرائح لتصفية بقية المحلول أو الصبغة من الشرائح.
8. إذا تغير لون الزايلين إلى اللون الزهري يجب تغييره.
9. يجب أن يكون مستوى المحاليل أو الصبغات أعلى من مستوى الشــــرائح (أي أن تكون الشرائح مغمورة كليا في المحلول أو الصبغة) لتجنب جفاف الشرائح وبالتالي ترسيب الصبغات بدل التفاعل.
10. يجب ترك أوعية المحاليل أو الصبغات مغلقة في حالة عدم استعمالها لتقليـــل عملية التبخر قدر الإمكان.
11. يفضل وضع الصبغات في أوعية داكنة لتقليل أثر الضوء على الصبغات.

الجزء الرابع

الصبغات الخاصة Special Stain

قبل البدء بالصبغات الخاصة هناك أمور مشتركة أربعة بينها جميعها وهي:-

1. وصل المقاطع للماء وتتم بالخطوات التالية:

   (أ) إزالة الشمع بالزايلين.

   (ب) إعادة التميه بتدرج كحولي تنازلي 100% ثم 95% ثم 70% ثم ماء مقطر.

2. هناك الصبغة المطلوبة والصبغة المتممة حيث تكون الصبغة المتممة هدف تسهيل (الدراسة) حيث يعطيContrast.

3. تحتاج معظم الصبغات ، إن لم تكن جميعها وجود مقاطع ضابطة للصبغةControl إيجابية.

4. النهاية : وهي إزالة الماء والتجفيف ثم الترويق بالزايليين ثم التغطية بوسط التغطية D.P.X إلا في الحالات النادرة فيتم التغطية مباشرة بوسط تغطية مائي.

أولا : صبغة الألياف الشبكية Gomori(Reticulin stain)

الهدف: صباغة الألياف الشبكية (reticulin fibers)

المحاليل المستخدمة:

1- 1% بيرمنغنات البوتاسيوم، يذاب 1غم بيرمنغنات البوتاسيوم في 100مل ماء مقطر.

2- ثنائي كبريتات الصوديوم تركيز 2% يذاب Sodium Metabisulfite في 100مل ماء مقطر.

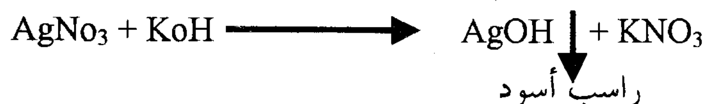
3- 2% شب الحديد يذاب 2 غم في شب الحديد Iron Ammonium Sulfate (Iron Alum) في 100 مل ماء مقطر يذاب مع التحريك لفترة طويلة.

4- محلول الفضة:

أ) يحضر 50 مل من نترات الفضة تركيز 10% بإذابة 5غم من نترات الفضة في 50 مل ماء مقطر.

ب) يحضر 50 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز10%.

ج) يأخذ 40مل من محلول نترات الفضة تركيز10% ويضاف إليه 10مل من هيدروكسيد البوتاسيوم 10% فيحصل التفاعل التالي:



د) نتخلص من السائل الرائق (يحتوي على نترات البوتاسيوم) ويغسل الراسب (هيدروكسيد الفضة) عدة مرات بالماء المقطر ثم يصفى(يتخلص من السائل) حيث يبقى الراسب في قعر الإناء .

هـ) يضاف محلول الأمونيا (هيدروكسيد الأمونيوم) قطرة قطره حتى يذوب الراسب كليا فيحدث التفاعل التالي:



$$AgOH + NH_4OH \longrightarrow Ag(NH_3)_2 + H_2O$$

و) يضاف كمية قليلة من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم قطرة قطره حتى يصبح المحلول ضبابي(Cloudy) وذلك للتخلص من الفائض من الأمونيا.

ي) نكمل حجم المحلول إلى 100مل بالماء المقطر (D.W) ثم يوضع المحلول في قارورة داكنة(dark bottle) حيث يصبح المحلول جاهز للعمل.

5- محلول الفورمالين تركيز4% يذاب 4مل من محلول الفورمالين المركز في 96مل ماء مقطر.

6- محلول كلوريد الذهب تركيز 0.2% يذاب 1غم من كلوريد الذهب في 100مل ماء مقطر فيصبح التركيز 1% يكون محلول مركز (Stock solution) ثم يأخذ 20مل من المحلول المركز ويضاف اليه 80 مل ماء مقطر فيصبح المحلول عملي بتركيز 0.2%.

7- محلول ثيوكبريتات الصوديوم Sodium Thiosulfate تركيز 2% حيث يذاب 2غم منه في 100 مل ماء مقطر.

مبدأ الصبغة:

تعتمد هذه الصبغة على مبدأ حب الألياف الشبكية للفضة(Argyrophil) حيث يعمل محلول بيرمنغنات البوتاسيوم على أكسدة مجموعات الهيدروكسيد النشطة في الألياف الشبكية إلى مجموعات الدهايديه وباستخدام المرسخ(شب الحديد يتم ارتباط الفضة على الألياف الشبكية) ثم يتم اختزال الفضة التي تترسب على الألياف الشبكية بلون بني مسود ثم يتم تثبيت

الصبغة باستخدام محلول كلوريد الذهب ويتم التخلص من الفائض من كلوريـــد الذهب بواسطة – **ثيوكبريتات الصوديوم**

الطريقة:-

1- وصل المقاطع النسيجية للماء(إزالة الشمع Deparffinization بواســطة الزايليين ثم اعادة التميه Rehydration بتدرج كحولي تنازلي حتى الماء.

2- غمر الشرائح بمحلول بيرمنغنات البوتاسيوم لمــدة دقيقتــين (تتأكسـد مجموعات الهيدروكسيد الى مجموعات الدهايد).

3- اغسل الشرائح بالماء الجاري بشكل جيد.

4- أغمر الشرائح بمحلول(Sodium Metabisulfite) لمدة خمسة دقائق ويعمل كمزيل للون ثم أغسل الشرائح بالماء الجاري.

5- أغمر الشرائح بمحلول شب الحديد (Iron Alum) لمدة خمسة دقائق .

6- أغسل الشرائح بالماء المقطر ثلاثة مرات.

7- أغمر الشرائح بمحلول الفضة(Silver solution) لمدة 5-10 دقائق.

8- أغسل الشرائح ثلاثة مرات بالماء المقطر.

9- أغمر الشرائح بمحلول الفورمالين (عامل مختزل) حيث يختزل الفضة مــن الحالة الأيونية إلى الحالة الذرية لمدة 5 دقائق ثم أغســل الشــرائح بالمـاء الجاري.

10- أغمر الشرائح في محلول كلوريد الذهب تركيز2,% لمدة عشرة دقـــائق وذلك لتوضيح الصبغة وتثبيتها ثم أغسل الشرائح بالماء الجاري.

11- أغمر الشرائح في محلول(Sodium Metabisulfite) لمدة دقيقتــين ثم اغسل الشرائح بالماء الجاري.

12- أغمر الشرائح بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم(Sodium Thiosulfate) لمدة خمسة دقائق ثم أغسل الشرائح بالماء الجاري.

13- أصبغ الشرائح بصبغة متممه Counter Stainويفصل الهيماتوكسلل أو أحمر متعادل Neutral Red.

14- بعد انتهاء الصيغة المتممة تجفف الشرائح بتدرج كحولي تصاعدي ثم تنقى بالزايلين ثم تغطى بواسط التغطية مثل D.P.X ثم تفحص الشرائح مجهريا.

النتيجة:

الألياف الشبكية باللون الأسود

الخلفية حسب الصبغة ألمتممه.

الألياف الكولاجينيه رمادي غامق إلى ارجواني.

ثانيا: صبغة الحديد (Iron Stain) (Perl's Stain)

الهدف من الصبغة:-

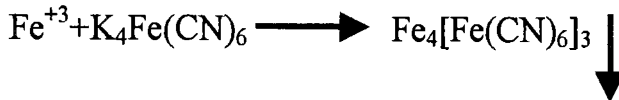
الكشف عن الهيموسيدرين Hemesiderin وهو عبارة عن مخازن الحديد في الجسم وغالبا ما يخزن الحديد بشكل طبيعي في نخاع العظم ولكن ولأسباب غير طبيعية (مرضية) يتم ترسيب الحديد على شكل هيموسدرين في أنسجة مختلفة في الجسم حيث يمكن الكشف عنه بهذه الطريقة.

مبدأ الصبغة:

يعتمد مبدأ الصبغة على إنتاج نواتج ملونه من مواد غير ملونه نتيجة تفاعلات كيميائية حسب التفاعلات التالية:

1- يعمل حامض الهيدروكلوريك المخفف بتحرير الحديد من الهيموسدرين ولا يتحرر من كل من الهيموجلوبين او الميوجلويين)

2- يتفـــاعل الحديـــد المحــرر مـــع حديـــد و ســـــيانيد البوتاســـــيوم (Potassium ferro cyanide) (K4fe (CN)6) ليكون مركـــب معقـــــد هــــو حديـــــد وســـــاينيد البوتاســــيوم الحديـــــدي (Ferric Ferro cyanide) وهـــو مـــا يعـــرف بـــازرق بروشـــيا Prucian product حسب التفاعل التالي:



$$Fe^{+3} + K_4Fe(CN)_6 \longrightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 \downarrow$$

راسب ازرقBlue ppt

(أزرق بوشيا)Prucian product

المحاليل :-

محلول أ) يتكون من 2% حامض الهيدروكلوريك 2% HCL يضـــاف 2مل من حامض الهيدروكلوريك إلى 98مل ماء مقطر.

محلول ب) يذاب 2غم من حديد وسيانيد البوتاسيوم potassium ferrocyanide في 100مل ماء مقطر.

المحلول العملي:

يمزج كميتين متساويتين من محلول أ+محلول ب

الطريقة:

1- وصل المقاطع للماء حسب البداية لمعظم الصبغات الخاصة.
2- أغمر المقاطع في المحلول العملي لمدة نصف ساعة حيث يحـــدث التفاعل حسب ما ذكر سابقا.
3- أغسل الشرائح بالماء المقطر.

4- أغمر الشرائح بصبغـــة الأيوســـين أو صبغـــة أحمـــر متعـــادل Neutral Red (صبغة متممة) Counter Stain لمدة خمســـة دقائق.

5- جفف الشرائح بسرعة في الكحول التصاعدي ثم نقي الشـــرائح بالزايلين ثم غطها بوسط التغطية D. P.X

النتيجة: الهيوسدرين أزرق

الخلفية: أحمر أو زهري حسب الصبغة المتممة.

ثالثا: الصبغة الثلاثية Masson Trichrom

الهدف: تميز الألياف الكولاجينية عن غيرها من المكونات النسيجية

المبدأ :

تعتمد الصبغات الثلاث في هذه الصبغة على مبدأ واحد وهـــو تفـــاعل حامض مع قاعدة Acid-base Reaction وهو نفس مبدأ الصبغة الروتينيـــة (Hematoxylin and Eosin (H&E) ولكن بالأخذ بعـــين الاعتبـــار إلى طريقة دخول الصبغة إلى المكونات النسيجية على عدة أمور أهمها عملية الامتصاص والادمصـــاص(Absorption and adsorption) بالإضافـــة إلى النفاذيـــة الإختيارية وخاصة التجاذب نتيجة اختلاف الشحنة بين المكونـــات النســـيجية و الصبغة ونتيجة تباين الوزن الجزئي للصبغات المتممة المستخدمة في هذه الطريقـــة تتباين النفاذية الاختيارية بينهما كما تعتمد هذه الصبغة على عملية التمايز حيـــث أن إرتباط الصبغة مع المكونات النسيجية يعتمد على بناء روابط بينهما فيما يقـــوم محلول التمييز بتكسير الروابط الزائدة:

أي أن الصبغة تعتمد على ثلاثة أمور في مبدأها:

1- تفاعل حامض مع قاعدة Acid- base reaction

2- النفاذي الاختيارية Selective permeability

3- التمايز Differentiation

المحاليل (1) محلول بوان(Bouin"s Solution)

أ) 750 مل من محلول مشبع من حـــامض البكريـــك تركـــيز1% 1% Picric Acid.

ب) 250مل من محلول الفورمالين المركز.

ج) 50مل من حامض الخليك الثلجي.

(2) محلول صيغة الهيماتوكسلين ويتكون من محلولين هما:-

محلول (أ) يذاب 1غم هيماتوكسلين في 100مل ايثانول95%

محلول (ب) يتكون من 4 مل كلوريد الحديديك تركيز29%، ماء مقطر 95مـــل، حامض الهيدروكلوريك HCLالمركز 1مل.

المحلول العملي: يمزج كميتين متساويتين من محلول أ و محلول ب.

(3) محلول الصيغة الأولى وهـــو(Biebrich scarlet Acid Fuchsin)

ويحضر كالتالي: أ) محلول صبغة بيرخ القرمزي Biebrich scarlet بتركـيز 1% يلزم 95مل.

ب) محلول الفوكسين الحامض بتركيز 1% يلزم 10مل.

ح) حامض الخليك الثلجي يلزم 1مل .

4 – محلول حامض الفوسفوتنجستك – حامض الفوسفوموليبديك

Phosphomolybdic- Phospho- Tungestic Acid Solution

ويتكون من

أ. حامض الفوسفوتنجستك Phosphotungstic Acid 5غم.

ب. حامض الفوسفومولبوك phospho molybdic 5غم.

ج. ماء مقطر 100 مل

5- محلول أزرق الأنلين Anilin blue:

أ) أزرق الانلين 2.5غم

ب) حامض الخليك الثلجي 2مـــل

ج) ماء مقطر 100مل

3- محلول حامض الخليك الثلجي 1%

أ) حامض الخليك الثلجي 1مل

ب) ماء مقطر 100 مل.

الطريقة:

1- يزال الشمع بالزايلين وتعاد الاماهه بالتدرج الكحولي التنـــــازلي حتى تصل الشرائح للماء المقطر.

2- توضع الشرائح في محلول بوان لمدة ساعة على درجـــــة حـــرارة 56^{0}م.

3- تبرد الشرائح ثم تغسل بالماء الجاري حتى يختفي اللون الأصفر.

4- تغسل الشرائح بالماء المقطر.

5- توضع الشرائح في محلول صبغة الهيماتوكســـلين Weigertes Hematoxylin لمدة 10دقائق ثم تغسل بالماء الجاري لمـــدة 10 دقائق ثم تغسل بالماء المقطر.

6- توضع الشرائح في صبغة Biebrich- Scarlet- Acid fuchsin لمدة عشرة دقائق.

7- تغسل الشرائح بالماء المقطر.

8- توضع الشرائح في المحلول المكون من حامض الفوسفوتنجيستك – حامض الفوسفوموليبدات لمدة 15 خمسة عشر دقيقة.

9- تغسل الشرائح بالماء المقطر.

10- توضع الشرائح في محلول أزرق الانلين لمدة خمسة دقائق.

11- تغسل الشرائح بالماء المقطر.

12- توضع الشرائح في محلول حامض الخليك الثلجي 2-5 دقائق .

13- تجفف الشرائح بالكحول التصاعدي ثم تروق بالزايلين ثم تغطى بوسط التغطية D. P. x.

النتيجة:

الأنويه	باللون الأسود
ألياف الكولاجين	باللون الأزرق
بقية المكونات النسيجية	باللون الأحمر

رابعا:- صبغة أحمر الكونجو Congo Red Stain :

صبغة الأميلوريد Amyloid stain

الهدف من الصبغة: الكشف عن وجود الأميلويد في الأنسجة

الأميلويد:– مادة شبيهه بالنشا تترسب بين الخلايا في حالات مرضية في كثير من الأنسجة وخاصة الأوعية الدموية وهي تتكون من بروتين بنسبة 95% ونسبة 5% مواد كربوهيدراتية ويقسم من الناحية المرضية إلى قسمين :–

1- أميلويد أولي Primary Amyloidosis ويصيب العضلات و الجلد واللسان و القناة الهضمية و القلب و الأعصاب الطرفية حيث أن وجود الأميلويد في هذه الحالة يعتبر هو المرض.

2- أميلويد ثانوي secondary Amyloidosis وهو الأكثر شيوعا ويرافق بعض الحالات المرضية مثل السل الرئوي، التهاب المفاصل، قرحة الأمعاء الغليظة، أما أكثر الأعضاء تأثرا بهذا النوع فهي الكلي، الغدة فوق الكلوية بالإضافة إلى حالات السرطان مثل سرطان نخاع العظم و سرطان الغدة الدرقية و سرطان العقد اللمفاويه.

مبدأ الصبغة:

تعتمد هذه الصبغة على تكوين روابط هيدروجينية بينها وبين بروتين الأميلويد.

المحاليل اللازمة:-

المحلول الأول: محلول الصبغة (1) أحمر الكونجو 1غم Congo red

(2) ماء مقطر 100غم

المحلول الثاني: 1% من هيدروكسيد الصوديوم

هيدروكسيد الصوديوم 1غم

ماء مقطر 100 غم

المحلول الثالث: محلول الكحول القاعدي

هيدروكسيد الصوديوم 1% 1مل

إيثانول 50% 100مل

المحلول الرابع: صبغة هيماتوكسيلين.

وقد سبق ذكر تحضيرها في موضوع الصباغة، و الطريقة هي:-

1- وصل المقاطع النسيجية للماء حسب مـــا ذكـــر في الصبغـــات السابقة.

2- أغمر الشرائح في محلول الصبغة (أحمر الكونجو) لمدة ساعة.

3- أغسل الشرائح بالماء المقطر بسرعة غطتين الى3.

4- أغمس الشرائح في محلول التمييز (الكحـــــول القـــاعدي مـــع التحريك 3-4 غطات.

5- أغسل المقاطع بالماء الجاري لمدة خمسة دقائق.

6- أصبغ الشرائح بصبغة الهيمانوكسلين لمدة خمسة دقائق.

7- أغسل الشرائح بالماء الجاري لمدة 15خمسة عشر دقيقة.

8- جفف المقاطع بالكحول التصاعدي وروقها بـــالزايلين ثم غـــط المقاطع بوسط التغذية D.P.X .

النتيجة: **الأملويد** **زهري إلى أحمر**

الأنويه **أزرق**

خامسا: صبغة Periodic Acid Schiff Reaction PAS:

الهدف:

الكشف عن المواد الكربوهيدراتيه في الانسجة وهذه المركبات اما ان تكون منفردة مثل الجلايكوجين او مرتبطة مع مواد بروتينية مثل glycoprotein أو Mucoprotein أو Mucopolysaccharide أو مرتبطة مع دهون مثل glycolipid ولكن بهذه الصبغة لا يمكن تميز المواد المخاطية المتعادلة من المواد المخاطية الحامضية لأنها تصبغ جميع المواد المخاطية الحامضية والمتعادلة وللتميز بين هذه المواد تصبغ الشرائح أولا بصبغة الأليشين Alcian Blue) فتصبغ المواد المخاطية الحامضية ثم بصبغة PAS .

المكونات النسيجية التي تميز بهذه الصبغة هي:-

جميع المكونات النسيجية التي تحتوي على مواد كربوهيدراتية مثل الجلايكوجين، المواد المخاطية، الفطريات، الغشاء القاعدي Basement Membrane وغيرها.

مبدأ الصبغة:

تتم أولا اكسدة المواد الكربوهيدراتيه بعامل مؤكسد مثل فوق اكسيد اليود Periodic Acid حيث تتحول مجموعات الجلايكول في عديدات التسكر Polysaccharide إلى مجموعات الدهايديه.

ثانيا :- تفاعل مركب شيف Schiff Reagent مع الالدهايد يعيد تشكل المركب بحيث يعيد له اللون وتسمى هذه العملية(Recoloration) ورغم ان هذه الصبغة خاصة بالمواد عديدة التسكر الا انها تصبغ مركبات اخرى عديدة في الانسجة مثل بعض البروتينات وبعض المركبات التي تحتوي على مجموعات امينية.

المحاليل:-

1- **محلول فوق اكسيد اليود Periodic Acid**: يستخدم بتركيز 0.5% حيث يذاب 0.5غم في 100مل ماء مقطر في حالة كونه بلورات صلبة اما اذا كان محلول غالبا ما يكون تركيز المحلول 50% فيأخذ 1 مل من المحلول المركز ويضاف الى 99مل ماء مقطر.

2- **محلول شيف: Schiff Reagent**: قبل البدء بتحضير محلول شيف يجب غسل جميع الادوات المستخدمة بالكحول الحامضي جيدا ثم بالماء المقطر عدة مرات.

أ) يحضر محلول حامض الهيدروكلوريك (HCL)(0.25N) لتر واحد.

ب) يذاب 10غم من الفوكسين القاعدي(Basic fuchsin)في المحلول السابق.

ج) يذاب 19غم (Sodium Melabisulfite) يجب استعمال المحرك المغناطيسي Magnatic strier في التحضير حيث ان ذوبان المواد يحتاج الى وقت طويل قد يصل الى24 ساعة ويجب تغطية المحلول جيدا اثناء التحضير.

د) يترك المحلول في مكان معتم لمدة يومين حتى يصبح اللون يشبه لون القش Straw Color .

هـ) يضاف 10غم فحم نشط Activated charcoal ويحرك جيدا ثم يرشح بورق الترشيح، اذا لم يكن اللون صافيا تعاد الخطوة (هـ) مره اخرى حتى يصبح اللون صافيا(Colorless)عديم اللون.

و) يكمل الحجم الى لتر اذا كان حجم المحلول بعد الترشيح اقل بواسطة الماء المقطر ويحفظ في وعاء داكن Dark bottle ويحفظ بالثلاجة على درجة 4^0م.

ز) يتم استعمال كمية قليلة من المحلول كل مرة 50-100 مل حيـــث تكـون صالحة للأستعمال لمدة اسابيع ، اما بقية المحلول فتبقى صالحة للأستعمال لعـدة اشهر قد تصل الى سنه اذا حفظت بشكل جيد حسب ما ذكر .

الطريقة:-

1- وصل المقاطع للماء حسب ما ذكر في الصبغات السابقة

2-اغمر المقاطع في محلول فوق اكسيد اليودPeriodic Acid بتركـــيز 0.5% لمدة 15 دقيقه.

3- اغسل المقاطع بالماء المقطر 3 مرات.

4- اغمر المقاطع في محلول شيف Schiff Reagent واتركها في الثلاجة على درجة حراره 4^0م في الظلام لمدة 20-30 دقيقية.

5- اغسل المقاطع بالماء الجاري Tap Water لمدة عشر دقائق .

6- اصبغ الانوية بصبغة الهيماتوكسلين لمدة خمسة دقائق ثم بالماء الجـــاري ثم بمحلول كربونات الليثيوم ثم بالماء المقطر .

7- جفف المقاطع بالكحول التصاعدي ثم روقها بالزايلين ثم غطي المقاطع بوسط التغطية Maunting بواسطة D.P.X

النتيجة:

ايجابية	+ve	PAS	لون ارجواني
سلبية	-ve	PAS	لون زهري فـــاتح
الانوية			لون ازرق

ايجابية بحالة المكونات التالية:-

1- عديدة التسكرPolysaccharide مثل الجلايكوجين.

2- المـــواد المخاطيـــــة Mucous substance و تشمـــــل Mucoprotin و Mucopoly Sacharide.

3- مركبات Glycoprotein

4- مركبات Glycolipid

5- الغشاء القاعدي Basment Membrane

6- الاميلويد.

7- الفطريات Fungus مثل Candida

8- بعض الصبغيات.

9- مواد الـ Thyroid colloid.

تمييز الجلاكوجين:

في بعض الحالات المرضية يتم تخزين الجلايكوجين بكميات كبيرة في بعض الانسجة مثل انسجة الكبد و العضلات ولتميز الجلايكوجين عن بقية المكونـــات التي تأخذ نتيجة ايجابية مع صبغة PAS نتبع الخطوات التالية:

استخدام انـــزيم التيـــالين (الفـــا اميلـــز) و المعـــروف باســـم أنـــزيم الدياستيز Diastase enzyme

مبدأ العمل :

يقوم انزيم الدياستيز بتحطيم الجلايكوجين الى سكريات أحادية وثنائيـــة فتحول النتيجة من ايجابية الى سلبية بالنسبة لصبغة PAS.

المحاليل:

1- محلول دياستيز تركيز 1% يذاب 1 غـــم مـــن الدباســـتيز في 100مل ماء مقطر.

2- صبغة محلول فوق اكسيد اليود Periodic Acid

3- محلول شيف Schiff reagent

الطريقة:

1-نصل بالمقاطع النسيجية حتى الماء حسب ما عرف سايقا .

2-توضع الشرائح في محلول الدياستيز لمدة ساعتين على درجـــة حـــرارة 37م.

3-تغسل المقاطع بالماء المقطر.

4-نكمل بصبغة PASحسب ألسابق.

النتيجة:

الجلايكوحين بدون هذه الطريقة إيجابي.

الجلايكو ن يعد الدياستيز سلبي

حتى تتم العمل بطريقة صحيحة يجب استعمال شريحتين مـــن العينـــة و شريحتين ضابط الصبغةControlوتقسم إلى مجموعتين:-

مجموعة أ) تشمل شريحة ضابط Control

شريحة من العينة Specimen

مجموعة ب)تشمل شريحة ضابطة

شريحة من العينة

1- توضع المجموعة أ في محلول الدياسيز وتبقى المجموعة ب في الماء المقطر حتى نهاية العملية.

2- يتم الجمع بين مجموعة أ ومجموعة ب بعد غسل مجموعة أ بالماء المقطر ويتم معاملتها بطريقة صبغة PASجميعها.

النتيجة:-

مجموعة أ الضابط Control سلبي ve -

العينة حسب النتيجة

مجموعة ب الضابط إيجـــابي ve+

العينة حسب النتيجة

سادسا:- صبغة ازرق الالشين Alcian blue:

الهدف:

تميز المواد المخاطية الحامضية عن المواد المخاطية المتعادلة حيث تعطي المـواد المخاطية الحامضية نتيجة إيجابية في هذه الصبغة بينما لا تصبـــغ المـــواد المخاطيـــة المتعادلة.

مبدأ الصبغة:

تكون روابط (أملاح) بين الصبغة و المواد المخاطية الحامضية على درجـة حموضة =PH=2.5 تصبغ معظم المواد المخاطية الحامضية بينمـــا تصبـــح المـــواد المخاطية المكبرته (التي تحتوي على كبريت) على درجة حموضة =1 حيث تكـــون الصبغة قاعدية ذات شحنة موجبة بينما تكون المواد المخاطية الحامضيه ذات شـحنة سالبة وتكون الأملاح ألمتكونه غير ذائبة.

تحضير المحاليل:

1- محلول ازرق الالشين	2.5=PH
أزرق الألشين	0.5 غم
حامض الخليك الثلجي	3 مل
ماء مقطر	100 مل

بعد تحضير الصبغة ترشح بورق الترشيح ثم يضاف عدة قطع من الثـــايمول لمنع العفن وتستخدم الصبغة خلال أسبوع من تحضيرها.

الطريقة:

1. وصل المقاطع للماء.
2. أغمر المقاطع في محلول الصبغة لمدة 30 دقيقة.

3. أغسل المقاطع بالماء الجاري لمدة خمسة دقائق.
4. أصبغ المقاطع بصبغة ثانوية مثل 1% أحمر متعادل و (1% Neutral Red).
5. جفف المقاطع بتدرج كحولي تصاعدي ثم روق المقاطع بالزايلين ثم غطها بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

المواد المخاطية الحامضية	لون أزرق
الأنوية	لون أحمر

محلول أزرق الألشين على درجة حموضة PH = 1 .

تحضير المحاليل:

أزرق الألشين 8 ج أكس 1غم

محلول حامض الهيدروكلوريك 0.1 جزيئي (0.1M Hcl Solution)

100 سم^{3}. **يرشح المحلول قبل الإستعمال**: المحلول صالح لمدة أسبوع من تاريخ التحضير.

1. وصل المقاطع النسيجية للماء.
2. أغمر المقاطع بمحلول الصبغة لمدة 30 دقيقة.
3. جفف المقاطع باستخدام ورق نشاف Filter Paper.
4. جفف المقاطع بالكحول الإيثيلي 95% بسرعة ثم بالكحول المطلق ثم روق المقاطع بالزايلين وغطها بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

المواد المخاطية المكبرته (التي تحتوي على الكبريتات تلون باللون الأزرق الغامق.

سابعا: صبغة الألشين الأزرق مقترنه بصبغة PAS :

الهدف:

تمييز المواد المخاطية الحامضية عن المواد المخاطيه المتعادلة.

الطريقة:

1. أصبغ المقاطع النسيجية بصبغة أزرق الألشين على درجة حموضة (2.5) بدون صبغة متممة.
2. تغسل المقاطع بالماء ثم بالماء المقطر .D.W ثم تكمل بطريقة PAS للنهاية.

النتيجة:

المواد المخاطية الحامضية	لون أزرق
المواد المخاطية المتعادلة	لون أرجواني
المواد الخليطة	بين الأحمر والأزرق

ثامنا: صبغة الكارمين للمواد المخاطية Mucicarmin:

الهدف:

صباغة المواد المخاطية جميعها (صبغة عامة للمواد المخاطية).

المبدأ:

تعتمد هذه الصبغة على تكون روابط أيونية بين الصبغة والمواد المخاطية حيث يعمل المحلول المنظم المكون من كلوريد الألمنيوم وهيدروكسيد الألمنيوم على التحكم بدرجة حموضة التفاعل بالإضافة إلى أن الكارمين ذو وزن جزيئي كبير فإنها لا تصلح لصباغة الأنوية.

المحاليل:

1. يحضر محلول صبغة هيماتوكسلين Weigert's بنفس طريقة تحضيره في الصبغة الثلاثية (Masson Trichrom).
2. محلول الصبغة Mucicarmine: يمزج 1غم من الكارمين مع 1غم من هيدروكسيد الألمنيوم جيدا ثم يضاف 100 مل إيثانول 50% ثم يضاف 0.5 غم من كلوريد الألمنيوم اللامائي ويحرك جيدا ثم يسخن على نار هادئة ويترك ليغلي لمدة دقيقتين ونصف أو في حمام مائي لدرجة الغليان بنفس الفترة ثم يبرد المحلول ويرشح ويحفظ بالثلاجة على درجة حرارة 4^0م في وعاء قاتم.

المحلول العملي:

يضاف 10 سم^3 من المحلول المركز إلى 90مل ماء مقطر.

الطريقة:

1. وصل المقاطع للماء
2. أصبغ الأنوية بصبغة هيماتوكسلين (Weigert's) ثم تغسل بالماء الجاري لمدة عشر دقائق.
3. أصبغ المقاطع بمحاليل الصبغة لمدة 30 – 45 دقيقة.
4. أغسل المقاطع بالماء المقطر ثم جفف بالكحول وروقها بالزايلين وغطي المقاطع بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

المواد المخاطية	أحمر
الأنوية	أسود

تاسعا: صبغة أخضر المثيل بايرونين Methylgreen Pyronin

الهدف:

تميز الحامض النووي الرايبوزي اللاوكسجيني DNA عن الحامض النووي الرايبوزي RNA.

مبدأ العمل:

صبغة أخضر مثيل صبغة قاعدية وكذلك صبغة البايرونين إلا أن التمـيز في الصبغة يعتمد على درجة الحموضة PH وعدد المجموعات الموجبـة ولأن صبغـة أخضر المثيل تحتوي على مجموعتين موجبتين فإنها تصبغ الـ DNA (لأنه مكـون من سلسلتين) أما صبغة البايرونين فتحتوي على مجموعة موجبة واحدة لذلك تصبغ الـ RNA لأنه مكون من سلسلة واحدة حيث أن كل من الصبغتين يرتبط فيـها المجموعات الموجبة مع مجموعات الفوسفات السالبة ودرجة الحموضة المنخفضـة (PH) =4.2 تزيد من خصوصية الصبغة.

المحاليل:

1. محلول أخضر المثيل

- أخضر المثيل 2.1 غم
- ماء مقطر 75 $سم^3$

2. محلول البايرونين:

- بايرونين 0.6 غم
- ماء مقطر 75 $سم^3$

تذاب المحاليل مع التحريك

3. **محلول خلات الصوديوم**

Sodium Acetate	1.64 غم
ماء مقطر	100 سم^3

4. **محلول حامض الخليك**

حامض الخليك	1.2 سم^3
ماء مقطر	100 سم^3

المحلول العملي:

محلول أخضر المثيل	75سم^3
محلول البايرونين	75سم^3

أمزج المحلولين وأترك المحلول الجديد على درجة حرارة 60^{0}م في وعاء محكم الإغلاق لمدة ساعتين.

يبرد المحلول ثم أضف – محلول خلات الصوديوم Sodium Acetate	90سم^3
محلول حامض الخليك	60سم^3

أترك المحلول بعد نهاية التحضير طوال الليل ثم يكون جاهز للإستعمال.

الطريقة:

1. وصل المقاطع للماء.
2. أترك المقاطع في محلول الصبغة لمدة 15 دقيقة.
3. جفف المقاطع بورق الترشيح.
4. مايز الصبغة بالماء المقطر غطة أو إثنين.
5. غط المقاطع بالأستون غطتين إلى ثلاث غطات.
6. روق المقاطع بالزايلين ثلاثة تغيرات دقيقة كل واحدة.
7. غطي المقاطع بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

الحامض النووي الرايبوزي RNA أحمر.

الحامض النووي الرايبوزي اللاكسجيني DNA أزرق.

عاشراً: صبغة الميلانين Masson Fontana:

الهدف:

الكشف عن وجود الميلانين في الخلايا بالحالات الطبيعية أو الحالات المرضية (الأورام الحميدة أو الأورام الخبيثة).

مبدأ الصبغة:

تعتمد الصبغة على قدرة الميلانين على إختزال الفضة في الحالة الأيونية إلى الحالات الذرية حيث تترسب على جزيئات الميلانين لتعطيها لون مميز وهو اللون الأسود ويمكن التأكد من أن اللون الأسود يعود إلى الميلانين وليس لمركبات أخرى (حيث أن هناك مركبات أخرى لها القدرة على إختزال الفضة) عن طريق إزالة لون الميلانين بطريقة تعرف بإسم (Bleaching) حيث تكون النتيجة إيجابية بدون إزالة اللون وسلبية مع إزالة اللون بينما المركبات الأخرى تكون إيجابية بالحالتين.

المحاليل:

محلول الفضة تركيز 10%

1. نيترات الفضة 10 غم
2. ماء مقطر 100 مل

يذاب نيترات الفضة بشكل جيد.

محلول العملي:

نأخذ 20سم^3 من محلول نيترات الفضة 10% ونضيف له أمونيا قطرة قطرة حيث يبدأ بتكوين راسب بني مسود نستمر بإضافة الأمونيا حتى يذوب الراسب ويصبح اللون ضبابي خفيف أما إذا كانت كمية الأمونيا زائدة أي صافي يضاف عدة قطرات من محلول نيترات الفضة قطرة قطرة حتى يصبح اللون ضبابي خفيف ثم نضيف 20 مل ماء مقطر ثم يرشح المحلول ويحفظ في زجاجة داكنة في الظلام.

ملاحظة:

يمكن صباغة مجموعتين من الشرائح مجموعة:

أ. شريحة من العينة + شريحة ضابطة.

ب. شريحة من العينة + شريحة ضابطة.

الطريقة:

1. وصل المقاطع النسيجية للماء.
2. ضع المقاطع في محلول الفضة العملية لمدة 12-24 ساعة.
3. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
4. أغمر المقاطع في محلول كلوريد الذهب Gold Chloride تركيز 0.2% لمدة خمسة دقائق.
5. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
6. أغمر المقاطع في محلول ثيوكبريتات الصوديوم (Sodium Thiosulfate) تركيز 5% لمدة دقيقتين.
7. أغسل المقاطع بالماء الجاري لمدة دقيقتين.

8. أصبغ الخلفية BackGround بصبغة متممة مثل صبغة الأيوسين أو صبغة أحمر متعادل Neutral Red لمدة دقيقتين.

9. أغسل المقاطع بالماء وجففها بتدرج كحولي تصاعدي وروقها بالزايلين ثم غطي المقاطع بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

الميلانين	أسود
الأنوية	أحمر

ملاحظة:

يمكن التأكد من أن الأشياء المصبوغة بالفضة بهذه الطريقة هي الميلانين تستعمل طريقة التبيض Bleaching.

محلول التبيض Bleaching Solution والطريقة:

1. نصبغ شرائح المجموعة أ وشرائح المجموعة ب بصبغة Masson Fontana لغاية خطوة رقم 7.

2. توضع شرائح المجموعة (ب) في محلول بيرمنغنات البوتاسيوم تركيز 1% لمدة ساعة ثم تغسل بالماء.

3. توضع مقاطع المجموعة (ب) في محلول حامض الأوكساليك (Oxalic Acid) تركيز 1% لمدة دقيقتين.

4. تغسل المقاطع بالماء المقطر ثم يجمع المجموعتين أ,ب معا ونكمل الصبغة بعد الخطوة السابعة.

النتيجة:

مجموعة (أ) العينة: ؟

الشريحة الضابطة إيجابية (أسود)

مجموعة (ب) العينة: ؟

الضابطة سلبية.

*إذا كانت نتيجة العينة إيجابية في المجموعة (أ) وسلبية في المجموعة (ب) هذا يعني وجود الميلانين.

*إذا كانت النتيجة إيجابية في المجموعتين يعني عدم وجود ميلانين وأن أشياء أخرى هي التي أخذت الصبغة إلا إذا كان خطأ في المحاليل أو الطريقة.

أحد عشر: صبغة PTAH (Phospho Tungestic Acid Hemotoxylin)

حامض الفوسفوتنجستك هيماتوكسلين.

مبدأ الصبغة:

تفاعل حامض مع قاعدة Acid-Base Reaction:

1. المكونات النسيجية (الألياف العضلية وغيرها) تكون غالبا من حيث الشحنة متعادلة فيتم معاملتها بمحلول ثنائي كرومات البوتاسيوم (Potassium Dichromate) الذي يكون أملاح الكروم مع المكونات النسيجة.

2. يتم أكسدة أملاح الكروم إلى حامض الكروميك Chromic Acid بفعل محلول بيرمنغنات البوتاسيوم حيث تصبح تلك المكونات النسيجية حامضية (تحمل شحنة سالبة).

3. يتم أكسدة الهيماتوكسلين بشكل طبيعي ليعطي مادة الهيماتين.

4. يضاف حامض الفوسفوتنجستك Phosphotungstic Acid إلى الهيماتوكسلين ليعمل كمرسخ للصبغة Mordant حيث تصبح الصبغة مع المرسخ قاعدية (موجبة الشحنة).

5. تتفاعل الصبغة (موجبة الشحنة) مع المكونات النسيجية المذكورة (سالبة الشحنة) على المبدأ المذكور سابقا.

الهدف:

تمييز العضلات المخططة ومكونات نسيجية أخرى مثل الفيبرين، غشاء الميلين وغيرها.

المحاليل:

1. محلول زنكر

المحلول المركز
Stock Solution

كلوريد الزئبق	50 غم
دايكرومات البوتاسيوم	25 غم
كبرتيات الصوديوم	10 غم
ماء مقطر	100 $سم^3$

تذاب المواد حسب الترتيب ويجب أن يذوب الهيماتوكسلين كليا قبل إضافة الحامض وتتم باستخدام المحرك المغناطيسي لمدة ساعتين على الأقل.

يضاف 0.177 غم من بيرمنغنات البوتاسيوم كعامل مؤكسد للصبغة إذا لزم استخدامها فورا وذلك لأن الأكسدة الطبيعية تحتاج إلى عدة أسابيع. تذاب المواد حسب الترتيب باستخدام المحرك المغناطيسي.

المحلول العملي:

يضاف 5سم^3 من حامض الخليك الثلجي إلى 95سم3 من محلو زنكــــر فيصبح المحلول جاهز للعمل.

2. محلول الصبغة:

هيماتوكسلين	1غم
حامض الفوسفوتنجستك	20غم
ماء مقطر	1000سم^3

3. محلول بيرمنغنات البوتاسيوم تركيز 0.5%.

بيرمنغنات البوتاسيوم	0.5 غم
ماء مقطر	100 مل

4. محلول حامض الأوكساليك.

حامض الأوكساليك	5 غم
ماء مقطر	100سم^3

5. محلول اليود Weigert's Iodine أو Gram Iodine

Potasium Iodate (Iodine)

المحلول	اليود	أيوديت البوتاسيوم	ماء مقطر
Weigert's Iodine	1 غم	2 غم	100 سم^3
Gram Iodine	1 غم	2 غم	300 سم^3

يجب إذابة أيودات البوتاسيوم كليا قبل إضافة اليود وذلك لتسريع ذوبــان اليود في المحلول

6. محلول شب الحديد تركيز 4% (4 % Iron Alum):

الطريقة:

1. وصل المقاطع للماء المقطر.
2. أغمر المقاطع في محلول زنكر العملي لمدة 24 ساعة أو على مدار الليل.
3. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
4. أغمر المقاطع في محلول اليود. في حالة استخدام Weigert's Iodine لمدة خمسة دقائق وفي حالة استخدام Gram Iodine لمدة خمسة عشر دقيقة
5. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
6. أغمر المقاطع في محلول يثوسلفات الصوديوم لمدة 5 دقائق ثم أغسل المقاطع بالماء.
7. أغمر المقاطع في محلول بيرمنغنات البوتاسيوم تركيز 0.5% لمدة خمسة دقائق.
8. أغسل المقاطع بالماء الجاري لمدة ثلاثة دقائق.
9. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
10. أغمر المقاطع بمحلول حامض الأوكساليك تركيز 5% لإزالة اللون لمدة أربعة دقائق.
11. أغسل المقاطع بالماء الجاري ثم بالماء المقطر.
12. أغمر المقاطع في محلول شب الحديد (Iron Alum) لمدة ساعة يعمل كعامل مرسخ.
13. أغسل بالماء الجاري ثم بالماء المقطر.
14. أغمر المقاطع في محلول الصبغة (PTAH) لمدة 24 ساعة أو على مدار الليل Overnight.
15. جفف المقاطع بسرعة بتدرج كحولي ثم روق المقاطع بالزايلين ثم غطها بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

العينة	اللون
الأنوية الألياف العضلية الألياف الفايبرين الألياف الكيراتين	**أزرق**
ألياف الكولاجين الألياف الشبكية الغشاء القاعدي الأنسجة الغضروفية	**أحمر إلى بني**

إثنا عشر: صبغة بكتيريا السل الرئوي Ziehl Neelsen Stain:

الهدف:

الكشف عن بكتيريا السل الرئوي

Tuberculous Bacilli (Acid Fast Stain)

المبدأ:

يعتمد مبدأ الصبغة على إقحام الصبغة للمكونات النسيجية وهي صبغة كاربول فوكسين (الفوكسين القاعدي) ثم معاملة المقطع النسيجي بمحلول حامضي مخفف تركيز 1% حامض الهيدروكلوريك حيث يعل على إزالة اللون من جميع مكونات المقطع النسيجي بإستثناء بكتريا السل الرئوي حيث يمتنع جدار البكتريا على الحامض ولذلك سميت هذه البكتريا بهذا الإسم (Acid Fast Bacilli) ثم تصبغ المقاطع بصبغة المثلين الأزرق حيث يصبغ كل المكونات النسيجية بإستثناء بكتريا السل الرئوي.

المحاليل:

1. محلول صبغة الفوكسين القاعدي:

يذاب 4غم من الفوكسين القاعدي Basic Fuchsin 100سم^3 في الماء المقطر بالتحريك بواسطة المحرك المغناطيسي ويفضل استخدام ماء مقطر ساخن لإذابة الصبغة ثم يضاف بلورات الفينول 8غم حوالي 10سم^3 إلى المحلول مع التحريك ثم يضاف 20سم^3 من الكحول الإيثيلي تركيز 95% مع التحريك الجيد، يرشح المحلول ثم يحفظ في قارورة نظيفة.

2. محلول الحامض: حامض الهيدروكلوريك 1سم^3

إيثانول 70% 99سم^3

3. محلول أزرق الميثيلين:

المحلول المركز Stock Solution	أزرق الميثلين	0.7 غم
	إيثانول 95%	50 سم^3

يرشح المحلول قبل الإستعمال

المحلول العملي:

محلول مركز 5 سم^3 (Stock Solution)

ماء حنفية Tap Water 45سم^3

الطريقة:

1. وصل المقاطع إلى الماء.
2. أغمر المقاطع في محلول صبغة الفوكسين القاعدي لمدة ساعة.
3. أغسل المقاطع جيدا في الماء الجاري Tap Water.
4. أغمر المقاطع في محلول الحامضي 1% حامض الهيدروكلوريك عـــدة غطات (5-10غطات) حتى يصبح لون المقـــاطع زهـــري فـــاهي (Pale Pink) وذلك باستخدام وعائين محتويان على الحامض.
5. أغسل المقاطع بالماء الجاري ثم بالماء المقطر.
6. أصبغ الشرائح بصبغة أزرق الميثلين العملي لمدة دقيقة.
7. جفف المقاطع بتدرج الكحول التصاعدي وبسرعة ثم روقها بـالزايلين ثم غطها بوسط التغطية D.P.X.

النتيجة:

بكتريا السل الرئوي: أحمر لامع

الخلفية Back Ground أزرق

ثلاثة عشر: صبغة الألياف المرنة Verhoeff-Van Gieson's-Stain

الهدف:

تمييز الألياف المرنة عن بقية المكونات النسيجية.

المبدأ:

تفاعل حامض مع قاعدة – Acid- Base- Reaction.

تتميز الألياف المرنة بوجود جسور فيها روابط الكبريت Disulfide Bond والتي تتأكسد بواسطة محلول اليود لتكون Sulfonic Acid تآين سالب (شحنة سالبة) حيث تكون محبة للصبغة القاعدية بقوة Strongly Basophilic لذلك تصبغ بواسطة الهيماتوكسلين.

يعمل محلول كلوريد الحديديك (Ferric Chloride) بدور مزدوج حيث يعمل كمرسخ للصبغة (يعطى الصبغة اللون الأسود) كما في حالة مزجة بالصبغة.

ثم يعمل كعامل تمييز بعد إنتهاء الصبغة Differentiation أما إستخدام صبغة Van Gieson فتكون كصبغة متممة.

المحاليل:

1. محاليل الصغبة المركزة:

محلول أ. هيماتوكسلين تركيز 5% يذاب 5غم من الهياتوكسلين في 100 سم^3 من الكحول الإيثيلي المطلق يجب أن يذوب الهيماتكسلين بشكل كامل.

محلول ب. محلول كلوريد الحديديك تركيز 10% يذاب 10غم من كلوريد الحديديك في 100 سم^3 من الماء المقطر.

محلول ج. محلول اليود Weigert's Iodine: يذاب 2غم من أيـــودات البوتاسيوم Potassium Iodate في 100 سم3 ماء مقطر ثم يذاب 1غم بلورات اليود في المحلول السابق مع التحريك.

المحلول العملي:

محلول أ	5% هيماتوكلسين	20سم^3
محلول ب	10% كلوريد الحديديك	8سم^3
محلول جـ	محلول اليود	8سم^3

2. محلول كلوريد الحديديك تركيز 2%.

3. محلول ثيوكبريتات الصوديوم تركيز 5%.

الطريقة:

1. وصل المقاطع للماء.
2. أغمر المقاطع النسيجية في محلول الصبغة لمدة ساعة.
3. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
4. أغمر المقاطع في محلول كلوريد الحديديك 10-20 غطة حتى يحدث تمايز بين الألياف المرنة (لون أسود) والخلفية رمادي.
5. أغسل المقاطع بالماء المقطر.
6. أغمر المقاطع بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم لمدة دقيقة.
7. أغسل المقاطع بالماء الجاري لمدة خمسة دقائق.
8. أصبغ الخلفية بصبغة Van Geison لمدة دقيقتين.
9. جفف المقاطع بالكحول الإيثيلي 95% ثم كحول مطلق بعدها روق المقاطع بالزايلين.

النتيجة:

الألياف المرنة	أسود	الكولاجين	أحمر
الأنوية	أسود	المكونات الأخرى	أصفر

ملحق رقم 1

إرشادات عامة

1. لمنع سقوط بعض المقاطع النسيجية غير المتماسكة عن الشرائح أثناء الصباغة يفضل مسح الشرائح بمحلول لاصق بياض البيض قبل تحميل المقاطع عليها ويحضر المحلول كالتالي.

محلول أ: يتكون من:

1. مسحوق الألبيومين 5غم
2. كلوريد الصوديوم 0.5 غم
3. ماء مقطر 100 $سم^3$

يذاب الألبيومين في ماء ساخن يضاف الملح وبعد التبريد يرشح المحلول.

محلول ب: جلسرين:

المحلول العملي 50$سم^3$ من محلول أ+50$سم^3$ من محلول الجلسرين وبعد ذلك يضاف عدة قطع من الثايمول لمنع نمو العفن.

2. **محاليل اليود المختلفة:**

المواد الكيميائية	محلول Lugol Iodine	محلول Weigert's Iodine	محلول Gram Iodine
بلورات اليود	1 غم	1 غم	1 غم
أيودات البوتاسيوم	2 غم	2 غم	2 غم
ماء مقطر	200 $سم^3$	100 $سم^3$	300 $سم^3$

وفي جميع الحالات يجب إذابة أيودات البوتاسيوم قبل اليود.

3. لإعادة صباغة الشرائح القديمة أو مصبوغة بصبغات أخرى.

1. إزالة غطاء الشريحة بواسطة الزايلين.
2. وصل المقاطع للماء Hydration.
3. معالجة المقاطع بمحلول 1% بيرمنغنات البوتاسيوم (عامل مؤكسد).
4. غسل الشرائح بالماء.
5. إزالة اللون بواسطة محلول حامض الأوكساليك تركيز 5%.
6. أغسل الشرائح بالماء ثم أصبغها بالصبغة الجديدة أو الصبغة المطلوبة.

4. إذا كانت صباغة الشرائح باهتة نتيجة وجود العينة لفترة طويلة في المثبت أو تعرضها لفترة طويلة من الزمن لمعامل إزالة التكلس أو نتيجة جفاف النسيج توضع الشرائح لمدة يوم كامل (24 ساعة) في محلول 5% Periodic Acid ثم يتبعها غسل الشرائح بالماء من 10-15 دقيقة ثم تصبغ من جديد.

5. إذا جفت العينة بعد تثبيتها نتيجة تبخر محلول التثبيت أو لسبب آخر توضع العينة في محلول Physiological Solution لمدة ساعة على الأقل قبل معاملتها في جهاز المعالجة أو وضعها في محلول يتكون من:

1) 95% كحول إيثلي 30 مل.
2) 10% فورمالين 50 مل.
3) 5% كربونات الصوديوم 20 مل.

حيث يوضع النسيج لمدة 24 ساعة في المحلول حتى يصبح النسيج طري ثم يستبدل ($\frac{1}{3}$) المحلول بـ (كحول 95% حتى يصبح النسيج متماسك وتكمل مرحلة المعالجة). ساعة على الأقل، أو توضع في محلول يتكون من 70 سم3 إيثانول+ 30 مل جلسرين لمدة ساعة.

6. لإزالة الصبغات عن الأيدي والملابس.

أ. لإزالة صبغة Basic Fuchsin يضاف قطرات من حامض الخليك المركز إلى كحول إيثلي 95%.

ب. لإزالة صبغة الكارمين تستعمل أمونيا مركزه أو HCL مخفف.

ج. لإزالة صبغة الـ Chromic Acid نستعمل حامض الكبيرتيك المخفف أو الأمونيا.

د. لإزالة الأصباغ الحامضية بشكل عام نستعمل محلول 5% Sodium thio sulfute مضاف إليه قطرات من حامض الكبريتك.

هـ. لإزالة الـ Hematoxytin نستعمل حامض ضعيف أو حامض الليمون.

و. لإزالة صبغة اليود نستعمل محلول 5% Sodium Thiosulfate.

ز. لإزالة صبغة أزرق المثيلين نستعمل محلول كحول إيثيلي 70% مضاف إليه 1 مل HCL.

ح. لإزالة صبغة الـ PAS نستعمل محلول 0.5% بيرمنغنات البوتاسيوم ثم تغسل بالماء وبعدها نستعمل محلول حامض الأوكساليك 1% (Oxalic Acid).

ط. لإزالة صبغة حامض البكريك Picric Acid نستعمل محلول 1% كربونات الليثيوم.

ك. لإزالة Elastic Stain نستعمل محلول 4% حامض السيتريك.

7. لإزالة الصبغات عن الأوعية والأواني الزجاجية والبلاستيكية نستعمل المحلول التالي:

أ. **المواد اللازمة:**

1. دايكرومات البوتاسيوم 20 غم

2. ماء مقطر 200 مل.

يذاب دايركومات البوتاسيوم في ماء حار ثم يبرد وبعد ذلك يضاف 20 مل حامض الكبريتيك المركز بالتدريج.

ب. **يستعمل 2% دايكرومات البوتاسيوم 900 مل.**

حامض الكبريتيك المركز 100 مل.

وبنفس الطريقة يذاب دايكرومات البوتاسيوم في ماء حار ثم يبرد ويضاف حامض الكبريتيك المركز بالتدريج.

8. تتأثر عينات العظام بمحاليل نزع الكلس الحامضية مما يؤدي إلى ضعف تقبلها لصبغة الهيماتوكسلين والحل هذه المشكلة تعالج المقاطع بمحلول كلوريد الأمونيوم تركيز 5% لمدة عشرة دقائق قبل وضعها في صبغة الهيماتوكسلين.

ملحق رقم 2

تحضير المحاليل الكيميائية:

أولا: النسبة:

أ. إذا كانت المادة المذابة صلبة ونقية لتحضير محلول تركيز س% نـأخذ س غم من المادة المذابة النقية ونذها في100سم^3 من المذيب.

ب. إذا كانت المادة الصلبة غير نقية (تحتوي على جزيئات الماء مثـلا) نحسب كمية المادة غير النقية المطلوبة حسب القاعدة التالية:

$$\frac{\text{وزن المادة النقية}}{\text{وزن المادة غير النقية}} = \frac{\text{الوزن الجزيئي للمادة النقية}}{\text{الوزن الجزيئي للمادة غير النقية}}$$

ولتحضير محلول من المادة إذا كانت غير نقية نحسب وزن المادة غير النقيـة المطلوبة حسب القاعدة السابقة ونذيبها في 100سم^3 في المذيب.

ج. إذا كانت المادة المذابة سائلة لتحضير محلول تركيزه س% نضيف س سم^3 من المادة المذابة إلى (100 –س)سم^3 من المذيب.

د. لتحضير محلول أقل تركيز من محلول أعلى تركيز نتبع القانون التالي:

س$_1$ × ح$_1$ = س$_2$ × ح$_2$ حيث س التركيز، ح الحجم.

أي تركيز المحلول الأول × حجم المحلول الأول =

تركيز المحلول الثاني × حجم المحلول الثاني

وبالتالي نحسب حجم المحلول الأكثر تركيز المطلوب ثم نكمل إلى حجـــم المحلول الأقل تركيز المطلوب.

ثانيا: المحاليل الجزيئية Molarity:

أ. إذا كانت المادة المذابة صلبة ونقية نتبع القانون التالي/

$$\text{الجزيئية (Molarity)} = \frac{\text{وزن المادة المذابة}}{\text{وزن الجزيئي للمادة المذابة}} \times \frac{1000}{\text{حجم المحلول}}$$

أي

$$\frac{\text{Wt Of Solute}}{\text{Molecular Wt of Solute}} \times \frac{1000}{\text{Volume Of Solution}}$$

ب. إذا كانت المادة المذابة صلبة وغير نقية (مثلا تحتوي على جزيئات مـــاء) نحسب وزن المادة غير النقية المطلوب حسب القانون في أولا فـــرع (ب) ونطبق القانون السابق.

ج. إذا كانت المادة المذابة مادة سائلة نقية نتبع القانون التالي:

$$\text{الجزيئيية (Molarity)} = \frac{\text{حجم المادة المذابة} \times \text{كثافة المادة المذابة}}{\text{الوزن الجزيئي للمادة المذابة}} \times \frac{1000}{\text{حجم المحلول}}$$

د. إذا كانت المادة المذابة سائل غير نقي نتبع القانون التالي:

$$\text{الجزيئية (Molarity)} = \frac{\text{حجم المادة المذابة} \times \text{تركيز المادة المذابة} \times \text{كثافتها}}{\text{الوزن الجزيئي للمادة المذابة}} \times \frac{1000}{\text{حجم المحلول}}$$

ثالثا: الأساسية Normality:

أ. إذا كانت المادة المذابة مادة صلبة نقية نتبع القانون التالي:

$$\text{الأساسية (Normality)} = \frac{\text{وزن المادة المذابة}}{\text{الوزن المكافئ للمادة المذابة}} \times \frac{1000}{\text{حجم المحلول}}$$

$$\text{الوزن المكافئ للمادة} = \frac{\text{الوزن الجزيئي}}{\text{التكافؤ}} \qquad \text{EquivalentWt} = \frac{\text{Molecular Wt}}{\text{Valency}}$$

التكافؤ: عدد ذرات الهيدروجين أو مجموعات الهيدروكسيل في المـــادة أو الشحنة أو الذرية.

ب. إذا كانت المادة صلبة غير نقية نحسب وزن المادة غير النقية المطلوب ونطبق القانون السابق.

ج. إذا كانت المادة المذابة سائل نقي نتبع القانون التالي:

$$\text{الأساسية (Normality)} = \frac{\text{حجم المادة المذابة} \times \text{كثافة المادة المذابة}}{\text{الوزن المكافئ للمادة المذابة}} \times \frac{1000}{\text{الحجم}}$$

د. إذا كانت المادة المذابة سائل غير نقي

نتبع القانون التالي:

$$\text{الأساسية (Normality)} = \frac{\text{حجم المادة المذابة} \times \text{كثافة المادة المذابة} \times \text{تركيزها} \times \text{التكافؤ}}{\text{الوزن الجزيئي للمادة المذابة (نقية)}} \times \frac{1000}{\text{حجم المحلول}}$$

ملحق رقم 3

بعض المواد الكيميائية والكواشف والصبغات

المستخدمة في مختبر علم الأمراض النسيجية

Histopathology Laboratory

	A
•	Acetic Acid Glacial
•	AnilineBlue Water Solube
•	Acid Fuchsin
•	Aluminium Potasium- Sulfate (Potasium Alum)
•	Aluminium Ammonium- Sulfate **(Ammonium Alum)**
•	Ammonium Ferric Sulfate (Iron Alum)
•	Acetone
•	Aluminium Chloride (Unhydrous)
•	Ammonia Solution
•	Alcian Blue
	B
•	Biebrich Scarlet
•	Basic Fuchsin
•	Biotanol
•	Borax (Disodium Tetra- Borate)
•	Bismark Brown
•	Boric Acid
	C
•	Chloral Hydrate
•	Crystal Violet
•	Congo Red
•	Carbol Fuchsin
•	Cresylecht Violet

•	Chromic Acid
•	Citric Acid
•	Cryotome Lubricant
•	Carmine
•	Charcol Activated
•	Calcium Chloride
	D
•	Depex
•	Diastase
•	Diff Quick Stain
	E
•	Ethanol Absolute
•	Ethanol 95%
•	Eosin Y
	F
•	Formalin 40%
•	Frozen Tissue Embedding Media (Histoprep)
•	Ferric Chloride 60%
•	Fast Green
	G
•	Gold Chloride
•	Giemsa Stain (Stock)
•	Glycerine
•	Gelatine

H	
•	Hydrochloric Acid
•	Hematoxylin
•	Hydroqionin
I	
•	Isopropanol
J.K.L	
•	Lip Freeze (Cryospray)
•	Lithium Carbonate
•	Light Green
M	
•	Methylene Blue
•	Methanol
•	Methyl Green
N	
•	Nuclear Fast Red
•	Nitric Acid
•	Neutral Red
O	
•	Oil Red O
•	Orcein
•	Oxalic Acid

	P
•	Paraffin Wax Pesstellafed 56-58c° Melting Point
•	PAP EA 50
•	PAP Orange G
•	Phosphotungstic Acid
•	Phosphomolybdic Acid
•	Potassium Ferrocyanide
•	Picric Acid
•	Phloxine B
•	Potassium Permengenate
•	Periodic Acid 50%
•	Potassium lodate
•	Potassium Dichromate
•	Potassium Metabisulfate
•	Pyronin Y
•	Phenol Crystal
•	Potassium Dihydrogen Phosphate
•	Potassium Hydroxide
•	Potassium Chloride
	Q-R
•	Rubeanic Acid
	S
•	Sodium Chloride
•	Sodium Metabisulfite
•	Silver Nitrate

•	Sodium Thiosulfate
•	Sodium Acetate
•	Sudan Black
•	Sodium Iodate
•	Schiff Reagent
•	Sulfurric Acid
•	Safranin
•	Sodium Hydroxide
•	Sylyle (Triethoxy Sylyle) Propylamin
T	
•	Toluidine Blue
•	Thymol
•	Thionen
X	
•	Xylene
W	
•	Write Stain

ملحق 4

اختبر معلوماتك

1- أحد المحاليل التالية يستخدم لتثبيت العينات النسيجية:-

أ) 10% Normal Saline

ب) 10%Formal Saline

ج) 10% Ethanuol

د) 10% Chloroform

2- الفورمالين المركز هو:-

أ) %10 Ethanol

ب) 40% Methanol

ج) 40% EthyLagdehyde

د) 40% MethyaLdehyde

3- يعمل الفورمالدهايد كمثبت على مبدأ:-

أ) تخثر الدهون

ب) تخثر البروتينات

ج) عمل روابط بين السكريات الاحادية

د) عمل روابط بين البروتينات

4- يعمل الإيثانول كمثبت على مبدأ:-

أ) عمل روابط بين البروتينات

ب) تخثر البروتينات

ج) تخثر الدهون

د) عمل روابط بين السكريات الاحادية.

5- حتى تتم عملية المعاينة ال Gross يشترط توفر جميع الأمور التالية:-

أ) العينة النسيجية

ب) النموذج المرفق

ج) المجهر

د) أدوات التشريح

6- يتراوح سمك المقاطع في المعاينة ال Gross بين:-

أ) 3-5سم ب)3-5ملم

ج) 3-5ميكرون د) 3-5نانوميتر

7- عملية التجفيف Dehydration تتم بأستخدام تراكيز مختلفة من أحد المحاليل التالية:-

أ) الميثانول ب) الايثانول

ج) الكلوروفورم د) الزايلين

8- جميع المواد التالية تصلح لعملية التنقية Clearing باستثناء:-

أ) الكلورفورم ب) الزايلين

ج) المثانول د) التولوين

9- عملية الاشباع Infiltration تتم باستخدام شمع برافين على درجة حرارة:-

أ) درجة حرارة الغرفة ب) على درجة الأنصهار

ج) على درجة حرارة 5 درجات فوق درجة الانصهار د) على درجة حرارة 5 درجات تحت درجة الانصهار

10- جهاز المعالجة الألي يفيد في توفير:-

أ) الوقت فقط ب) الجهد فقط

ج) الوقت والجهد د) عدد الخطوات

11- الطمر يعرف بالادماج لأنه يتم بعد عملية :-

أ) التثبيت ب) التجميد

ج) الإشباع د) التنقية

12-جميع المشاكل التالية لها علاقة بالطمر بإستثناء:-

أ) عدم وضع العينة على وجه القطع ب) وجود شوائب في مادة الطمر

ج) وجود بقايا من عينات أخرى مع العينة د) طبيعة العينة طرية صعبة القطع

13-وضع العينة على مستوى افقي واحد وبطريقة صحيحة خلال الطمر يفيد في:-

أ) الاستغناء عن عملية التقليم ب) عمل مقاطع رقيقة بطريقة يدوية

ج) الحصول على مقاطع جيدة د) تسهيل تحميل المقاطع على الماء

14- تركيز الكحول الإ يثيلي المفضل باستخدامه في عملية التحميل بعد القطع هو:-

أ) 5% ب)50%

ج)30% 100%

15-تتم عملية التقليم عادة على سمك يتراوح بين:-

أ) 5-10ميكرون ب) 15-20ميكرون

ج) 5-10ملم د)15-20ملم

16- درجة حرارة الماء المناسبة للتحميل هي:-

أ) درجة حرارة الغرفة ب) درجة انصهار الشمع

ج) 10 درجات فوق درجة انصهار الشمع د) 10درجات اقل من درجة انصهار الشمع

17- عملية التجفيف (Drying) بعد تحميل المقاطع تفيد في جميع الأمور التالية عدا:-

أ) تثبيت المقاطع على الشريحة ب) ذوبان الشمع من المقاطع

ج) التخلص من بقايا الماء والكحول د) انصهار الشمع من المقاطع

18- الصبغة العامة Hematoxylin and Eosin H&E

أ) تفاعل أكسدة واختزال
ب) تفاعل حامض مع قاعدة
ج) تفاعل إحلال بسيط
د) تعتمد على ذوبان الصبغة في المكونات النسيجية

19- الصبغة الحامضيه هي الصبغة التي يحمل فيها الشق الملون بشحنة:-

أ) سالبة
ب) موجبة
ج) متعادلة
د) ليس لها علاقة بالشحنة

20- صبغة الهيماتوكسلين للأنوية تتم بشكل غير مباشر Indirection وهذا يعني:-

أ) أن الصبغة تحتاج إلى عامل مختزل
ب) الصبغة تحتاج إلى عامل مرسخ
ج) الصبغة تحتاج إلى عامل مؤكسد
د) الصبغة تحتاج إلى وسط كحولي

21- الأكسدة الطبيعية للهيماتوكسلين تسمى:-

أ) التعقيق Ripening
ب) التزريق Blueing
ج) الترسيخ Mordenating
د) الترسيب Impregnation

22- لتقليل سرعة تأكسد الهيماتوكسلين بشكل طبيعي يجب أن تكون درجة الحموضة:-

أ) أقل من 7
ب) 7
ج) أكثر من 7
د) ليس لها علاقة بدرجة الحموضة

23- استعمال محلول مشبع من كربونات الليثيوم في الصبغة يفيد في:-

أ) ترسيخ الصبغة
ب) تزريق اللون
ج) أكسدة الهيماتوكسلين
د) لا شئ مما ذكر

24-الأيو سين صبغة حامضية حيث يصبغ المكونات النسيجية التي:

أ) تتأين لتحمل شحنة سالبة
ب) تتأين لتحمل شحنة موجبة
ج) لا تتأين
د) ليس لها علاقة بالتأين

25- أحد العبارات التالية صحيحة:-

أ) صبغة الهيماتوكسلين صبغة صناعية بينما صبغة الأيوسين صبغة طبيعية
ب) كل من صبغة الهيماتوكسلين والايوسين صناعية
ج) كل من صبغة الهيماتوكسلين والايوسين صبغة طبيعية
د) صبغة الهيماتوكسلين صبغة طبيعية بينما صبغة الايوسين صناعية

26-عملية التجفيف والتنقية بعد الصباغة ضرورية لان:_

أ) مادة التغطية متجانسة مع كل من الماء والكحول
ب) مادة التغطية متجانسة مع الماء وليست متجانسة مع الكحول
ج) مادة التغطية متجانسة مع الكحول وليست متجانسة مع الماء
د) مادة التغطية ليست متجانسة مع كل من الماء والكحول

27- أحد العوامل التالية ليست لها علاقة بالتغطية:-

أ) الحفاظ على الصبغة من التأكسد مع الزمن
ب) منع تلف المقاطع النسيجية
ج) منع تلف الشرائح
د) الحفاظ على الاختلاف في معامل الانكسار

28- Labelling تعني:-

أ) الرسم
ب)الوسم
ج) الوشم
د) لا شئ مما ذكر

29- تشخيص المقاطع بعد تجهيزها باستخدام شمع البرافين يتم باستخدام أحد المجاهر التالية:-

أ) المجهر الإلكتروني ب) المجهر الضوئي

ج) المجهر التشريحي د) العين المجردة

30- Cytology **تعني:-**

أ) دراسة الخلية من حيث التركيب والوظيفة ب) دراسة الخلايا التقشيريه

ج) دراسة خلايا الأوليات د) دراسة المقاطع النسيجية

31- تبعث العينة الخلوية على جميع الأشكال التالية باستثناء:-

أ) مسحات على شرائح ب) مقاطع على شرائح

ج) سوائل لزجة د) سوائل رائقة

32- المثبت الأفضل للعينات الخلوية هو:-

أ) الكحول المثيلي ب) الكحول الايثلي بتركيز70%

ج) الكحول الايثلي المطلق د) الكحول الايثلي بتركيز 95%

33- صبغة H&E **تستخدم لصباغة:-**

أ) المقاطع النسيجية المحضرة بشمع البرافين ب) الشرائح التي تحتوي على عينات خلوية

ج) المقاطع المحضرة بطريقة التجميد د) جميع ما ذكر

34- الهدف الرئيسي لدراسة العينات الخلوية هو:-

أ) تشخيص الأمراض الجرثومية المعدية ب) تشخيص الأمراض الطفيلية

ج) تشخيص مبكر للأمراض وخاصة الأورام د) تشخيص الأمراض النفسية

35- الاستخدام الأكثر لصبغة Pap Stain:-

أ) صباغة المقاطع النسيجية المحضرة بشمع البرافين

ب) صباغة المقاطع النسيجية المحضرة بطريقة التجميد

ج)صباغة العينات الخلوية

د) صباغة المقاطع المحضرة بـ Ultramicrotome

36 - جهاز القطع المستخدم في ال Cryostateمن النوع:-

أ) الدوار Rotary

ب)الانزلاقي Sliding

ج) فوق الرقيقUltramicrotome

د) الاهتزازي Vibratome

37-يتميز القطع باستخدام طريقة البرافين عن القطع المجمد بجميع المميزات التالية باستثناء:-

أ) المقاطع في البرافين متسلسلة بينما المقاطع المجمدة منفصلة

ب) المقاطع في البرافين أقل سمكا من المقاطع المجمدة

ج) تحضيرات مقاطع البرافين دائمة بينما تحضيرات المقاطع مجمدة

د) مقاطع البرافين عادة مثبتة بشكل دائم قبل الصباغة بينما المقاطع المجمدة مثبتة بشكل مؤقت قبل الصباغة

38- Cytospin جهاز يستخدم في:-

أ) المعالجة النسيجية

ب) للصباغة

ج) تحضير العينات الخلوية السائلة

د) طمر العينات

39- من الضروري الحذر عند الاشتغال بالعينات الخلوية وعينات القطع المجمد بدرجة أكبر وذلك بسبب:-

أ) لان معظم العينات في كلتا الحالتين مثبتة بالفورمالين

ب) لان معظم العينات في كلتا الحالتين ترسل غير مثبته

ج) لان جميع العينات في كلتا الحالتين تمثل أورام سرطانية

د) لان جميع العينات في كلتا الحالتين تمثل أمراض معدية

40- صبغة الدهون تعتمد على مبدأ:-

أ) صبغات حيوية

ب) الذائبية

ج) ترسيب الفضة

د) تفاعل أكسدة واختزال

41- الكريوستات: هو جهاز يستخدم لـ :-

أ) المعالجة النسيجية

ب) تحضير العينات الخلوية

ج) القطع المجمد

د) أي شئ مما ذكر

42- مادة الطمر المستخدمة في القطع المجمد تكون متجانسة مع:-

أ) الزايلين

ب) الماء

ج) الكحول

د) شمع البرافين

43- يمكن الحصول على مقاطع نسيجية محضرة بطريقة التجميد بسمك حتى :-

أ) 5ملم

ب) 5 نانوميتر

ج) 5 ميكرون

د) 5 انجسترون

44- يستخدم الكريوستات لجميع الحالات التالية باستثناء:-

أ) دراسة الدهون　　ب) دراسة الأنزيمات

ج) التشخيص السريع　　د) لدراسة الخلايا التقشيرية

45- صبغة جوموري Reticulin Stain تهدف إلى تميز:-

أ) الألياف الكولاجينية　　ب) الألياف المرنة

ج) الألياف الشبكية　　د) جميع ما ذكر

46- تعتمد صبغة جوموري Reticulin Stain على مبدأ:-

أ)ترسيب الفضة　　ب) تفاعل حامض مع قاعدة

ج) الذائبيه　　ج) صبغة حيوية

47- صبغة PAS تفيد في تميز كل المكونات النسيجية التالية باستثناء:-

أ) الجلايكوجين　　ب) الكولاجين

ج) الغشاء القاعدي　　د) المواد المخاطية

48-عندما تكون النتيجة إيجابية لـ PAS وسلبيه لـ PAS Diatase فإن ذلك دلالة على وجود :-

أ) الدهون　　ب) الجلايكوجين

ج) الكولاجين　　د) البروتينات

49- صبغة Masson Trichrome تفيد في تميز:-

أ)الألياف الشبكية　　ب)الألياف المرنة

ج)الألياف الكولاجينية　　د) الدهون

50- صبغة Congo Red من الصبغات الخاصة لأنها تميز:-

أ) الدهون　　ب) الاميلويد

ج) السكريات　　د) المواد المخاطية

51- صبغة الحديد(Perls) تفيد في الكشف عن الحديد في:-

أ) الهيموجلوبين
ب) الميوجلوبين
ج) الهيموسدريت
د) جميع ما ذكر

52- صبغة Ziehl Neelsen تعتمد على ميزة وهي:-

أ) تأثر البكتريا العضوية بدرجة كبيرة في محلول التميز
ب) عدم تأثر البكتيريا بمحلول التمييز
ج) ليس لمحلول التمييز علاقة بالصبغة
د) ليس لبكتيريا السل الرئوي علاقة بهذه الصبغة

53- محلول كلوريد الحديديك في صبغة Verhoeff's Elastic Stain يعمل كـ:-

أ) عامل مؤكسد للصبغة
ب) عامل مرسخ للصبغة
ج) عامل تمايز للصبغة
د) جميع ما ذكر صحيح

54- عند صباغة مقاطع نسيجه بصبغة الألشين الأزرق يتبعها صبغة PAS تكون النتيجة:-

أ) المواد المخاطية الحامضيه بلون احمر أما المتعادلة بلون أزرق
ب) المواد المخاطية الحامضيه بلون أحمر وكذلك المتعادلة بلون أحمر
ج) المواد المخاطية الحامضية و المتعادلة بلون أزرق
د) المواد المخاطية الحامضية بلون أزرق بينما المتعادلة بلون أحمر

55- صبغة الـ Masson Fontana تفيد في تميز:-

أ) الهيموسدرين
ب) الميلانين
ج) الاميلويد
د) الدهون

الإجابات

رقم السؤال	الإجابة	رقم السؤال	الإجابة
سؤال(1)	(ب)	سؤال(19)	(أ)
سؤال(2)	(د)	سؤال(20)	(ب)
سؤال(3)	(د)	سؤال(21)	(أ)
سؤال(4)	(ب)	سؤال(22)	(أ)
سؤال(5)	(ج)	سؤال(23)	(ب)
سؤال(6)	(ب)	سؤال(24)	(ب)
سؤال(7)	(ب)	سؤال(25)	(د)
سؤال(8)	(ج)	سؤال(26)	(د)
سؤال(9)	(ج)	سؤال(27)	(ج)
سؤال(10)	(ج)	سؤال(28)	(ب)
سؤال(11)	(ج)	سؤال(29)	(ب)
سؤال(12)	(د)	سؤال(30)	(ب)
سؤال(13)	(ج)	سؤال(31)	(ب)
سؤال(14)	(ج)	سؤال(32)	(د)
سؤال(15)	(ب)	سؤال(33)	(د)
سؤال(16)	(د)	سؤال(34)	(ج)
سؤال(17)	(ب)	سؤال(35)	(ج)
سؤال(18)	(ب)	سؤال(36)	(أ)

رقم السؤال	الإجابة	رقم السؤال	الإجابة
سؤال(37)	(جـ)	سؤال(46)	(أ)
سؤال(38)	(جـ)	سؤال(47)	(بـ)
سؤال(39)	(بـ)	سؤال(48)	(بـ)
سؤال(40)	(بـ)	سؤال(49)	(جـ)
سؤال(41)	(جـ)	سؤال(50)	(بـ)
سؤال(42)	(بـ)	سؤال(51)	(جـ)
سؤال(43)	(جـ)	سؤال(52)	(بـ)
سؤال(44)	(د)	سؤال(53)	(د)
سؤال(45)	(جـ)	سؤال(54)	(د)
سؤال(55)		(بـ)	

ملحق 5

بيان بالصور

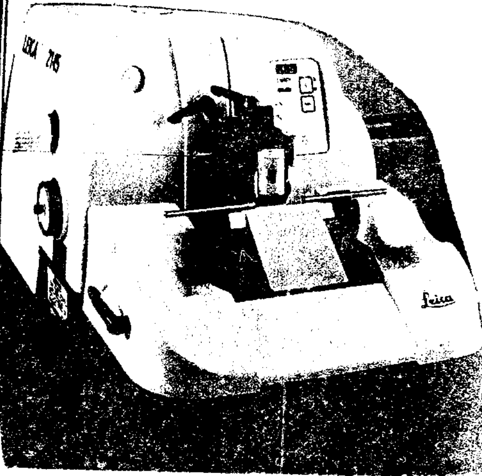
رقم الصورة	اسم الجهاز
صورة رقم 1	جهاز المعالجة النسيجية الآلي Tissue Processor
صورة رقم 2	جهاز القطع الدقيق Microtome
صورة رقم 3	المجهر المركب الضوئي Micro Scope
صورة رقم 4	مقطع نسيجي محضر من الكليه
صورة رقم 5	جعهاز الصباغة الآلي Autostainer
صورة رقم 6	جهاز القطع الجليدي Cryostate
صورة رقم 7	جهاز التحميل للمقاطع النسيجية Mounting Parth
صورة رقم 8	جهاز التحضير الخلوي Cytospin
صورة رقم 9	جهاز الطمر Embedding System
صورة رقم 10	جهاز شحذ السكاكين الدائمة Autosharp



جهاز المعالجة النسيجية الآلي

Tissue Processor

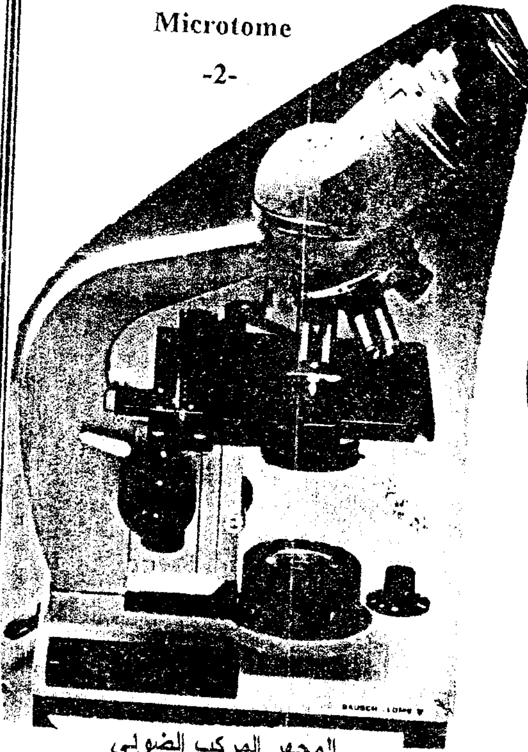
-1-



جهاز القطع الدقيق

Microtome

-2-



المجهر المركب الضوئي

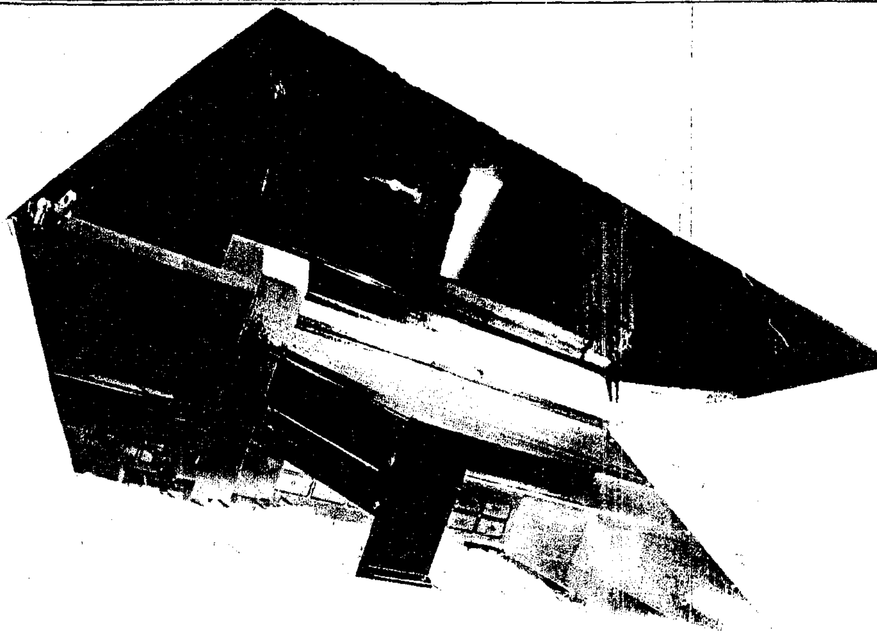
Micro s cope

-3-



مقطع نسيجي محضر من الكليه

-4-



جهاز الصباغة الآلي

Autostainer

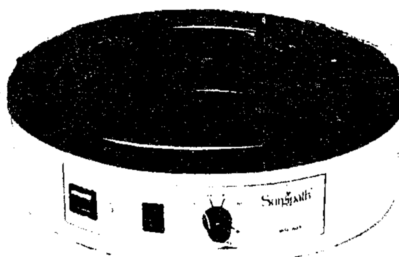
-5-



جهاز القطع الجليدي

Cryostate

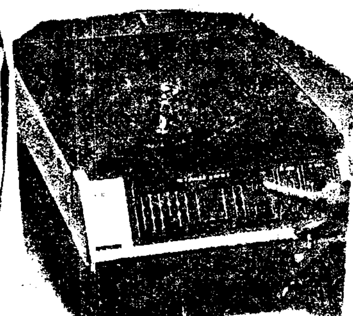
-6-



جهاز التحميل للمقاطع النسيجية

Mounting Pa th

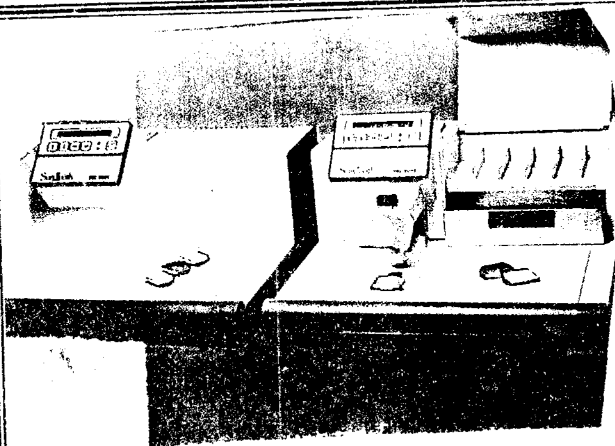
-7-



جهاز التحضير الخلوي

Cytospin

-8-



جهاز الطمر

Embidding System

-9-

جهاز شحذ السكاكين الدائمة

Autosharp

-10-

المراجع

▭ المراجع الأجنبية:

1. Histology and Cytology, Copy of a text book of Histology Bloom, W. and Frwcett D.W. 1968.
2. Cellular Pathology Technique, C.F.A. Culling, Others 4th edition.
3. Animal Tissue Techinque, Gretchen L.Humason, Third Edition.
4. Theory and practice of the histological techniquy, John D.Bancroft third Edition.
5. Histological Technique, Carletionis 5th Edition.
6. Compre Hesive Cyto Pathology, Marluce Bibbo.
7. Master Theises of Special Stain Mohammod AlNsoor.
8. Histology Technicians, By S.Rinckey.
9. Manual of Cyto technelogy, Catherine M. Keebler.

▭ المراجع العربية:

1. المبادئ الأساسية للتحضير المجهري، د. حميد الحاج.
2. دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي، د. حميد الحاج.
3. دوسية التحضير المجهري، علي أبو طير.
4. التحضير المجهري، د. عماد الخطيب – خلود أبو رمان.
5. أساسيات علم التحضير النسيجي، محمد الطره وآخرون.
6. أساسيات علم كيمياء الأنسجة النظرية والتطبيق، الأستاذ الدكتور نوري الطيب، الأستاذ بشير جرار.

فهرس

كتب الدار الصادرة

1. الكتب الطبية

علم وظائف الأعضاء
أساسيات طب العيون
تخزين الأدوية وحفظها
بنوك الدم
العلوم العامة
علم الأحياء الدقيقة جـ2/1
الكيمياء الحيوية
الإسعاف الأولي
مبادئ الصحة العامة
الاحياء الدقيقة / عملي
الدمويات / عملي
الأجهزة الطبية / عملي
الكيمياء التحليلية / عملي
الكيمياء العضوية / عملي
الكيمياء الحيوية / عملي
المناعة والأمصال / عملي
الإدرار والطفيليات / عملي
الكفايات العملية لتخصص المختبرات
إجراءات السلامة العامة في المختبرات الطبية
التحضير النسيجي المجهري
مقدمة في علم الأمراض

2. الكتب الهندسية والفنية

الاستشعار عن بعد في الهندسة المدنية
المواصفات العامة للأبنية
الهندسة البيئية
تكنولوجيا الخياطة
العقود والمواصفات وحساب الكميات
الهندسة الصحية
عقود المقاولات الانشائية
المطالبات والمخالفات في عقود المقاولات
تصميم المخططات والخياطة
مبادئ التصميم
تاريخ الفن ½

3. الكتب التجارية

أساسيات الإدارة الحديثة
مبادئ الاستثمار
مبادئ الاقتصاد
استراتيجية التسويق
أبعاد التنمية في الوطن العربي
إدارة المبيعات
مبادئ التسويق
أساسيات الإدارة المالية في القطاع الخاص
محاسبة التكاليف الصناعية
المحاسبة الحكومية
المالية العامة (علوم مصرفية)
التدريبات العملية في التجارة
المحاسبة الأولية
دراسات في محاسبة المنشآت الخاصة
تطبيقات المحاسبة على الحاسوب
أصول المحاسبة 1
أصول المحاسبة 2
علم تدقيق الحسابات
مبادئ القانون التجاري
المحاسبة الضريبية
الاقتصاد الكلي
الاقتصاد الجزئي

4. الكتب الإنسانية

الحقائب التدريبية
اللغة العربية – ثقافة عامة
مختارات من الشعر العربي الحديث
دراسات في اللغة والأدب
الإدارة والاشراف التربوي
دليل البحث والتقويم التربوي
الجغرافيا المناخية
الطبخ العربي باللغة الانجليزية
في رحاب محمد ﷺ "ديوان شعر"
سيكولوجية الطفولة
علم الاجتماع الطبي
فلسطين "أمة وحضارة"
السياسة الفرنسية تجاه الثورة العربية الكبرى
خطوة خطوة في الحج والعمرة
علم الاجتماع السياسي
عالمان مختلفان "الرجل والمرأة"
(قضايا الحرب والعنف والسلام
فقه العبادات (1) الطهارة والصلاة

5. كتب الحاسوب

الكمبيوتر وتطبيقاته
البرمجة بلغة التجميع جـ2/1
تركيب البيانات
معالجة النصوص
نظم تشغيل انجليزي
البرمجة الهيكلية بلغة باسكال

6. كتب العلوم

علم الطفيليات الطبي
ضبط الجودة النوعية
طرق التحليل الآلي
الفيزياء الكلاسيكية



دار المستقبل للنشر والتوزيع

لصاحبها فهيم سعيد مجدلاوي

تأسست عام 1984

==========

تعنى بطباعة ونشر الكتب العلمية

المؤلفة والمترجمة مساهمة منها في تعريب الكتاب الجامعي المتخصص

==========

عضو في اتحاد الناشرين الأردنيين

عضو في اتحاد الناشرين العـرب

تم صف واخراج
ومونتاج
الكتاب
على
جهاز الكمبيوتر
IBM
الخاص بالدار